

A biologia do
CÂNCER

Robert A. Weinberg



Equipe de Tradução

Bruna Selbach (Capítulos 2, 13 e Glossário) – Mestranda em Biologia Celular e Molecular, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS).

Clarissa Melo Czekster (Capítulo 5 e Índice) – Mestranda em Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Cláudia Paiva Nunes (Capítulo 14) – Doutora em Bioquímica, UFRGS. Pesquisadora, CP-BMF/IPB, PUCRS.

Cristopher Zandoná Schneider (Prefácio e Capítulo 1) – Doutor em Biologia Celular e Molecular, UFRGS. Pesquisador, CP-BMF/IPB, PUCRS.

Eraldo Luiz Batista Junior (Capítulo 8) – Doutor em Biologia Oral/Biologia Molecular e Celular, Boston University. Pesquisador/professor CP-BMF/IPB, PUCRS e Boston University.

Gaby Renard (Capítulos 4 e 16) – Doutora em Bioquímica, UFRGS. Pesquisadora, CP-BMF/IPB, PUCRS.

Isabel Cristina Werlang (Capítulos 9 e 10) – Doutoranda em Biologia Celular e Molecular, UFRGS.

Maria Martha Campos (Capítulo 15) – Doutora em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Pesquisadora/professora, CP-BMF/IPB, PUCRS.

Rafael Guimarães da Silva (Capítulos 7 e 12) – Doutorando em Bioquímica, UFRGS.

Rodrigo Gay Ducati (Capítulos 3 e 6) – Doutorando em Biologia Celular e Molecular, UFRGS.

Rodrigo Guerino Stabeli (Capítulo 11) – Doutor em Bioquímica, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP). Pesquisador/professor, Universidade Federal de Rondônia (UNIR).



W423b Weinberg, Robert A.
A biologia do câncer [recurso eletrônico] / Robert A.
Weinberg ; tradução Gaby Renard ... [et al.]. – Dados
eletrônicos. – Porto Alegre : Artmed, 2008.

Editado também como livro impresso em 2008.
ISBN 978-85-363-1568-3

1. Biologia. 2. Oncologia. 3. Genética – Câncer. I. Título.

CDU 616-006:577

Catálogo na publicação : Mônica Ballejo Canto – CRB10/1023

A biologia do CÂNCER

Robert A. Weinberg

Founding member of the Whitehead Institute for Biomedical Research.
Daniel K. Ludwig Professor for Cancer Research and the American
Cancer Society Research Professor at the Massachusetts Institute of Technology.

Consultoria, Supervisão e Revisão Técnica desta Edição:

CLÁUDIA PAIVA NUNES
Doutora em Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).
Pesquisadora, CP-BMF/IPB, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do
Sul (PUCRS).

DIÓGENES SANTIAGO SANTOS
Doutor em Microbiologia, NY University Medical Center, USA. Professor/
pesquisador, CP-BMF/IPB, PUCRS.

GABY RENARD
Doutora em Bioquímica, UFRGS. Pesquisadora, CP-BMF/IPB, PUCRS.

JOCELEI MARIA CHIES
Doutora em Biologia Molecular, Universidade de Brasília (UnB). Pesquisadora,
CP-BMF/IPB, PUCRS.

RAFAEL GUIMARÃES DA SILVA
Doutorando em Bioquímica, UFRGS.

Versão impressa
desta obra: 2008



2008

Obra originalmente publicada sob o título *The Biology of Cancer*
ISBN 978-0-8153-4076-1

© 2007 by Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC
All Rights Reserved. Authorized translation from English language edition published by Garland Science,
part of Taylor & Francis Group LLC.

Capa:
Mário Röhnelt

Preparação de originais:
Daniele Cunha

Supervisão editorial:
Leticia Bispo de Lima

Editoração eletrônica:
AGE – Assessoria Gráfica e Editorial Ltda.

Este livro contém informações obtidas de fontes autênticas e altamente respeitáveis. O material reimpresso é citado com permissão, e as fontes são indicadas. Foram feitos todos os esforços para detalhar corretamente a origem das figuras e publicar dados e informações confiáveis, porém o autor e o editor não podem assumir a responsabilidade pela legitimidade de todos os materiais e pelas consequências de seu uso.

Capa Frontal

As células de carcinoma na margem externa de uma ilha destas células tumorais freqüentemente sofrem uma transição epitelial-mesenquimal,

o que permite a elas se locomover e invadir o estroma adjacente. Aqui são vistas células epiteliais mamárias humanas experimentalmente transformadas que expressam citoqueratinas (*vermelho*), as quais são típicas de células epiteliais. Contudo, as células de carcinoma humano, em contato com o estroma circundante de camundongo (revelado por núcleos *azuis*), cessaram sua expressão de queratina e, no lugar, expressam vimentina (*verde*), um marcador de células mesenquimais. Estas células também mudaram de forma, e algumas já invadiram amplamente o estroma circundante. (Cortesia de Kimberley A. Hartwell e Tan A. Ince.)

Reservados todos os direitos de publicação, em língua portuguesa, à
ARTMED® EDITORA S.A.
Av. Jerônimo de Ornelas, 670 - Santana
90040-340 Porto Alegre RS
Fone (51) 3027-7000 Fax (51) 3027-7070

É proibida a duplicação ou reprodução deste volume, no todo ou em parte,
sob quaisquer formas ou por quaisquer meios (eletrônico, mecânico, gravação,
fotocópia, distribuição na Web e outros), sem permissão expressa da Editora.

SÃO PAULO
Av. Angélica, 1091 - Higienópolis
01227-100 São Paulo SP
Fone (11) 3665-1100 Fax (11) 3667-1333

SAC 0800 703-3444

IMPRESSO NO BRASIL
PRINTED IN BRAZIL

Dedicatória

Este livro é dedicado à minha esposa, Amy Shulman Weinberg, que resistiu às longas horas nas quais minha atenção estava focada em nada mais a não ser este livro e que pacientemente ouviu minhas afirmações de que ele estaria finalizado em breve, embora eu soubesse muito bem que não tinha a menor idéia de quanto tempo este projeto realmente levaria. Seu constante apoio e amor tornaram-no possível.

Prefácio

Este livro descreve o desenvolvimento de uma área relativamente nova da biologia. Os primórdios desta área da pesquisa biomédica remontam, com certa precisão, às descobertas, em 1975, concernentes ao proto-oncogene, feitas no laboratório de H. E. Varmus e J. M. Bishop, em São Francisco, Califórnia. A pesquisa realizada desde aquela época produziu uma rica quantidade de informações sobre as moléculas e os genes responsáveis pelo câncer nos seres humanos.

Antes desta pesquisa pioneira, não sabíamos quase nada sobre os mecanismos moleculares e celulares que geravam o câncer. Contudo, existiam algumas pistas interessantes antes da formação da comunidade de pesquisadores do câncer: sabíamos que os agentes carcinogênicos freqüentemente, mas nem sempre, funcionavam como mutagênicos; isso sugeriu que genes mutantes estavam envolvidos, de alguma forma, na programação da proliferação anormal das células cancerosas. Sabíamos que o desenvolvimento do câncer era, com freqüência, um processo longo, protraído. E sabíamos que células cancerosas individuais extraídas de tumores se comportavam de modo muito diferente de suas equivalentes em tecidos normais.

Hoje, após mais de três décadas, temos uma abundância de informações sobre as causas basais do câncer – quase em excesso. Os genes e as proteínas implicados na sua origem podem ser enumerados às centenas. E descobriu-se que mesmo o câncer não é apenas uma doença, mas várias, estando os agentes anteriormente mencionados envolvidos na criação dos cerca de 110 diferentes tipos de cânceres humanos até agora catalogados. As técnicas de análise genética, que eram bastante primitivas no início desse período, hoje avançaram a um estágio em que podemos sequenciar genomas inteiros de mamíferos e catalogar centenas de alelos mutantes presentes nos genomas de células cancerosas humanas. Nos primeiros anos deste novo milênio, somos inundados com uma vasta quantidade de informações genéticas, bioquímicas e de biologia celular acerca do desenvolvimento do câncer, quase excedendo o que a mente humana pode assimilar e compreender.

Este livro foi escrito para apresentar as leis subjacentes e os princípios que estão emergindo do vasto conjunto de fatos que, a cada ano que passa, crescem em quantidade. Tais leis e princípios explicam vários dos complexos comportamentos dos tumores humanos. Dando contexto e perspectiva, eles podem ser usados para auxiliar a entender muitos – possivelmente todos – tipos de cânceres humanos. Essa área da pesquisa biológica ainda está em crescimento, e novas e fascinantes descobertas estão sendo relatadas praticamente a cada mês. Dessa forma, muitos princípios do desenvolvimento do câncer também ainda estão sendo descobertos. Entretanto, já podemos perceber as linhas gerais de algumas verdades duradouras, que, dentro do possível, estão apresentadas neste livro.

Em parte, este livro foi escrito como panfleto de recrutamento, visto que novas gerações de pesquisadores são necessárias para o avanço da pesquisa do câncer. A campanha para vencê-lo apenas começou. Os princípios elucidados durante as três décadas passadas, e que são o assunto deste livro, ainda não foram aplicados com êxito para fazer grandes incursões na prevenção, no diagnóstico e na cura dos cânceres humanos.

E, sim, ainda existem questões importantes que permanecem nebulosas e mal resolvidas. Ainda não compreendemos como as células cancerosas aprendem a invadir e criar as metástases, que são responsáveis por 90% da mortalidade do câncer. Temos um entendimento ainda muito imperfeito do papel do sistema imune na prevenção do desenvolvimento da doença. E, embora saibamos muito sobre as moléculas de sinalização individuais que operam no interior das células humanas, falta-nos um entendimento claro de como o complexo sistema

de circuitos de sinalização que elas formam é capaz de operar para tomar as decisões de vida ou morte que determinam o destino de células individuais dentro de nosso corpo. Essas decisões, em última análise, determinam se uma de nossas células iniciará ou não uma jornada pelo longo caminho que leva à proliferação cancerosa e, finalmente, a um tumor capaz de ameaçar a vida.

A pesquisa contemporânea do câncer tem enriquecido inúmeras outras áreas da moderna pesquisa biomédica. Como consequência, muito do que você irá aprender com este livro será útil no entendimento de muitos aspectos de imunologia, neurobiologia, biologia do desenvolvimento e uma dezena de outras áreas da pesquisa biomédica. Aprecie o passeio!

Robert A. Weinberg

Nota ao Leitor

Este livro está organizado em 16 capítulos de extensão bastante variável. Eles são concebidos para serem lidos na ordem em que aparecem, cada um ampliando as idéias que foram apresentadas nos capítulos anteriores. O primeiro capítulo é um curso resumido de revisão para estudantes de graduação que estão cursando ou já cursaram biologia; ele apresenta os conceitos fundamentais postulados nos capítulos subseqüentes. O principal propósito é ilustrar os conceitos que, em conjunto, constituem nossa atual concepção a respeito de como o câncer surge e como essa doença deve ser tratada no futuro. Alguns experimentos são descritos em detalhes, para indicar a lógica que sustenta vários desses conceitos. Você encontrará muitos desenhos esquemáticos, freqüentemente associados a micrografias, que irão ajudá-lo a avaliar como os resultados experimentais foram reunidos, peça por peça, gerando as conclusões que sustentam a moderna pesquisa do câncer.

Ao longo do texto são encontradas as “Barras laterais”, que consistem em comentários que se desviam ligeiramente do foco principal da discussão. Muitas vezes, elas contêm anedotas ou elaborações sobre idéias apresentadas no texto principal. Leia-as, se estiver interessado, ou passe adiante, se achar que elas o distraem muito. As Barras laterais são apresentadas para trazer mais interesse e um pouco de tempero extra na rica sopa de idéias que constitui a pesquisa contemporânea nesta área.

Há consideráveis referências cruzadas sempre que tópicos em discussão forem introduzidos ou descritos nos outros capítulos. Muitas foram inseridas para o caso de você ler os capítulos em uma ordem diferente da aqui apresentada. Elas não devem lhe induzir a continuamente folhear outros capítulos a fim de rastrear as seções ou figuras citadas. Se você achar que se beneficiará das introduções anteriores a um tópico, use essas referências cruzadas; de outra forma, ignore-as.

Cada capítulo termina com um resumo retrospectivo, intitulado “Sinopse e perspectivas”, que sintetiza os principais conceitos, remete a idéias que permanecem assunto de discussão e considera qual o rumo que a pesquisa pode tomar no futuro. Essa visão geral é ampliada por uma lista de conceitos-chave e um conjunto de questões. Algumas questões são deliberadamente desafiadoras, e esperamos que elas o provoquem para pensar de modo mais profundo sobre muitas das questões e dos conceitos desenvolvidos. Por fim, a maioria dos capítulos tem uma lista extensa de artigos de revistas de pesquisa. Estes serão úteis se você quiser explorar em detalhe um tópico específico. Quase todas as referências são artigos de revisão, e muitas contêm discussões detalhadas de várias subáreas de pesquisa, bem como descobertas recentes. Além disso, há referências esporádicas a publicações mais antigas, que irão esclarecer como certas linhas de pesquisa se desenvolveram*.

Talvez o objetivo mais importante seja capacitar-lhe a ir além do livro-texto e mergulhar diretamente na literatura primária de pesquisa. Portanto, parte do texto é dirigida para o ensino do vocabulário elaborado e especializado da literatura de pesquisa do câncer, e muitos de seus termos são definidos no glossário. O tipo **negrito** foi usado por toda parte para ressaltar termos-chave que devem ser entendidos. A pesquisa do câncer, assim como a maioria das áreas da pesquisa biomédica contemporânea, é composta por inúmeras abreviaturas e acrônimos, que se espalham pelos textos de muitos artigos publicados. Este livro dá respostas para decifrar essa “sopa de alfabeto”, definindo esses acrônimos e abreviaturas em uma lista ao final do livro.

* Consulte www.artmed.com.br para materiais de apoio ao professor.

Como este livro descreve uma área de pesquisa em que novas e excitantes descobertas estão sendo anunciadas o tempo todo, alguns detalhes e interpretações aqui apresentados poderão se tornar desatualizados (ou, o que é igualmente provável, invalidados). Ainda assim, os conceitos primários permanecem, visto que eles se baseiam em fundamentações sólidas de resultados experimentais. O autor e o editor apreciariam enormemente seu retorno. Foram feitos todos os esforços para minimizar os erros; no entanto, você poderá encontrá-los, e seria um grande favor se os comunicasse. E, o mais importante, boa parte da ciência aqui contida exigirá reinterpretações nos próximos anos, à medida que são feitas novas descobertas. Por favor, mande-nos um e-mail com suas sugestões para tboc@taylorandfrancis.com, as quais serão consideradas para incorporação em edições futuras.

Agradecimentos

A ciência descrita neste livro é obra de uma comunidade de pesquisa grande e muito interativa espalhada por todo o mundo. Durante a geração passada, seus membros avançaram imensuravelmente na compreensão do câncer. Os colegas listados a seguir auxiliaram o autor em incontáveis aspectos, grandes e pequenos, dando ótimos conselhos, referindo-me à literatura científica crítica e analisando questões científicas complexas e ocasionalmente contenciosas. Eles são representantes dessa comunidade, cujos membros estão, virtualmente sem exceção, disponíveis e têm o prazer de dar um auxílio prestativo àqueles que o solicitarem. Sou muito grato a eles. Não estão nesta lista os muitos colegas que, generosamente, cederam versões de alta qualidade de suas imagens publicadas; o agradecimento a eles está disposto ao longo das citações da literatura, nas legendas das figuras.

Joan Abbott; Eike-Gert Achilles; Jerry Adams; Kari Alitalo; James Allison; David Alpers; Fred Alt; Carl Anderson; Andrew Aprikyan; Jon Aster; Laura Attardi; Frank Austen; Joseph Avruch; Sunil Badve; William Baird; Frances Balkwill; Allan Balmain; Alan Barge; J. Carl Barrett; David Bartel; Renato Baserga; Richard Bates; Philip Beachy; Camille Bedrosian; Anna Belkina; Robert Benezra; Thomas Benjamin; Yinon Ben-Neriah; Ittai Ben-Porath; Bradford Berk; René Bernards; Anton Berns; Kenneth Berns; Monica Bessler; Neil Bhowmick; Marianne Bienz; Line Borge; Harald von Boehmer; Gareth Bond; Thierry Boon; Dorin-Bogdan Borza; Chris Boshoff; Noël Bouck; Thomas Brabletz; Douglas Brash; Cathrin Braken; Garrett Brodeur; Patrick Brown; Richard Bucala; Patricia Buffler; Tony Burgess; Suzanne Bursaux; Randall Burt; Stephen Bustin; Janet Butel; Lisa Butterfield; Blake Cady; John Cairns; Judith Campisi; Harvey Cantor; Robert Cardiff; Peter Carroll; Arlindo Castelinho; Bruce Chabner; Ann Chambers; Howard Chang; Andrew Chess; Ann Cheung; Lynda Chin; Francis Chisari; Yunje Cho; Margaret Chou; Karen Cichowski; Michael Clarke; Hans Clevers; Brent Cochran; Robert Coffey; John Coffin; Samuel Cohen; Graham Colditz; Kathleen Collins; Dave Comb; John Condeelis; Suzanne Cory; Christopher Counter; Sara Courtneider; Sandra Cowan-Jacob; John Crispino; John Crissman; Carlo Croce; Tim Crook; Christopher Crum; Marcia Cruz-Correa; Gerald Cunha; George Daley; Riccardo Dalla-Favera; Alan D'Andrea; Chi Dang; Douglas Daniels; James Darnell, Jr.; Robert Darnell; Galina Deichman; Titia de Lange; Hugues de Thé; Chuxia Deng; Edward Dennis; Lucas Dennis; Ronald DePinho; Theodora Devereaux; Tom DiCesare; Jules Dienstag; John DiGiovanni; Peter Dirks; Ethan Dmitrovsky; Daniel Donoghue; John Doorbar; G. Paolo Dotto; William Dove; Julian Downward; Glenn Dranoff; Thaddeus Dryja; Raymond DuBois; Nick Duesbery; Michel DuPage; Harold Dvorak; Nicholas Dyson; Michael Eck; Walter Eckhart; Argiris Efstratiadis; Robert Eisenman; Klaus Elenius; Steven Elledge; Elissa Epel; John Eppig; Raymond Erikson; James Eshleman; John Essigmann; Gerard Evan; Mark Ewen; Guowei Fang; Juli Feigon; Andrew Feinberg; Stephan Feller; Bruce Fenton; Stephen Fesik; Isaiah Fidler; Gerald Fink; Alain Fischer; Zvi Fishelson; David Fisher; Richard Fisher; Richard Flavell; Riccardo Fodde; M. Judah Folkman; David Foster; Uta Francke; Emil Frei; Errol Friedberg; Peter Friedl; Stephen Friend; Jonas Frisen; Elaine Fuchs; Margaret Fuller; Yuen Kai (Teddy) Fung; Kyle Furge; Amar Gajjar; Joseph Gall; Donald Ganem; Judy Garber; Frank Gertler; Charlene Gilbert; Richard Gilbertson; Robert Gillies; Doron Ginsberg; Edward Giovannucci; Inna Gitelman; Steve Goff; Lois Gold; Alfred Goldberg; Mitchel Goldfarb; Richard Goldfarb; Joseph Goldstein; Susanne Gollin; Mehra Golshan; Todd Golub; Jeffrey Gordon; Michael Gordon; Siamon Gordon; Martin Gorovsky; Arko Gorter; Joe Gray; Douglas Green; Yoram Groner; John Groopman; Steven Grossman; Wei Gu; David Guertin; Piyush Gupta; Barry Gusterson; Daniel Haber; James Haber; William Hahn; Kevin Haigis; Senitiroh Hakomori; Alan Hall; Dina Gould Halme; Douglas Hanahan; Philip Hanawalt; Adrian Harris; Curtis Harris; Lyndsay Harris; Stephen Harrison; Kimberly Hartwell; Leland Hartwell; Harald zur Hausen; Carol Heckman; Ruth Heimann; Samuel Hellman; Brian Hemming; Lothar Hennighausen; Meenhard Herlyn; Glenn Herrick; Avram Herskho; Douglas Heuman;

Richard Hodes; Jan Hoeijmakers; Robert Hoffman; Robert Hoover; David Hopwood; Gabriel Hortobagyi; H. Robert Horvitz; Marshall Horwitz; Alan Houghton; Peter Howley; Robert Huber; Tim Hunt; Tony Hunter; Stephen Hursting; Nancy Hynes; Richard Hynes; Antonio Iavarone; J. Dirk Iglehart; Tan Ince; Max Ingman; Mark Israel; Kurt Isselbacher; Tyler Jacks; Rudolf Jaenisch; Rakesh Jain; Bruce Johnson; David Jones; Richard Jones; William Kaelin, Jr.; Raghu Kalluri; Alexander Kamb; Barton Kamen; Manolis Kamvysselis; Yibin Kang; Philip Kantoff; Paul Kantrowitz; Jan Karlseder; Michael Kastan; Michael Kauffman; William Kaufmann; Robert Kerbel; Scott Kern; Khandan Keyomarsi; Marc Kirschner; Christoph Klein; George Klein; Yoel Kloog; Alfred Knudson; Frederick Koerner; Anthony Komaroff; Kenneth Korach; Alan Korman; Eva Kramarova; Jackie Kravaka; Wilhelm Krek; Charlotte Kuperwasser; James Kyranos; Carole LaBonne; Peter Laird; Sergio Lamprecht; Eric Lander; Laura Landweber; Lewis Lanier; Andrew Lassar; Robert Latek; Lester Lau; Derek Le Roith; Chung Lee; Keng Boon Lee; Richard Lee; Jacqueline Lees; Rudolf Leibel; Mark Lemmon; Christoph Lengauer; Jack Lenz; Gabriel Leung; Arnold Levine; Beth Levine; Jay Levy; Ronald Levy; Fran Lewitter; Frederick Li; Siming Li; Frank Lieberman; Elaine Lin; Joachim Lingner; Martin Lipkin; Joe Lipsick; David Livingston; Harvey Lodish; Lawrence Loeb; Edward Loechler; Michael Lotze; Lawrence Lum; Vicky Lundblad; David MacPherson; Sendurai Mani; Alberto Mantovani; Sandy Markowitz; Larry Marnett; G. Steven Martin; Seamus Martin; Joan Massagué; Patrice Mathevet; Paul Matsudaira; Andrea McClatchey; Frank McCormick; Patricia McManus; Mark McMenamin; U. Thomas Meier; Matthew Meyerson; George Miller; Nathan Miselis; Randall Moon; David Morgan; Rebecca Morris; Simon Conway Morris; Simon Conway Morris; Robert Moschel; Bernard Moss; Paul Mueller; Anja Mueller-Homey; William A. Muller; Gregory Mundy; Karl Mürger; Lance Munn; Ruth Muschel; Lee Nadler; David G. Nathan; Jeremy Nathans; Sergei Nedospasov; Benjamin Neel; David Neuhaus; Donald Newmeyer; Leonard Norkin; Lloyd Old; Kenneth Olive; Tamer Onder; Moshe Oren; Terry Orr-Weaver; Barbara Orbourne; Michele Pagano; David Page; Asit Parikh; Chris Parker; William Paul; Amanda Paulovich; Tony Pawson; Mark Peifer; David Pellman; David Phillips; Jacqueline Pierce; Malcolm Pike; John Pintar; Maricarmen Planas-Silva; Roland Pochet; Daniel Podolsky; Beatriz Pogo; Roberto Polakiewicz; Jeffrey Pollard; Nicolae Popescu; Christoph Poremba; Richmond Prehn; Carol Prives; Vito Quaranta; Peter Rabinovitch; Al Rabson; Priyamvada Rai; Klaus Rajewsky; Sridhar Ramaswamy; Anapoorani Rangarajan; Jeffrey Ravetch; Ilaria Rebay; John Reed; Steven Reed; Steven Reed; Alan Rein; Ee Chee Ren; Elizabeth Repasky; Jeremy Rich; Andrea Richardson; Dave Richardson; Darrell Rigel; James Roberts; Diane Rodi; Clifford Rosen; Jeffrey Rosen; Neal Rosen; Naomi Rosenberg; Michael Rosenblatt; Theodora Ross; Martine Roussel; Steve Rozen; Jeffrey Ruben; José Russo; David Sabatini; Julien Sage; Ronit Sarid; Edward Sausville; Charles Sawyers; David Scadden; David Schatz; Christina Scheel; Joseph Schlessinger; Anja Schmidt; Stuart Schmidt; Robert Schoen; Robert Schreiber; Edward Scolnick; Ralph Scully; Harold Seifried; William Sessa; Jeffrey Settleman; Fergus Shanahan; Jerry Shay; James Sherley; Charles Sherr; Ethan Shevach; Chiaho Shih; Frank Sicheri; Peter Sicinski; Sandy Simon; Dinah Singer; Arthur Skarin; Jonathan Skipper; Judy Small; Gilbert Smith; Lauren Sompayrac; Holger Sondermann; Gail Sonenshein; Deborah Spector; Michael Sporn; Eric Stanbridge; E. Richard Stanley; Louis Staudt; Philipp Steiner; Ralph Steinman; Gunther Stent; Sheila Stewart; Charles Stiles; Jonathan Stoye; Michael Stratton; Bill Sugden. Takashi Sugimura; John Sullivan; Nevin Summers; Calum Sutherland; Clifford Tabin; John Tainer; Jussi Taipale; Shinichiro Takahashi; Martin Tallman; Steven Tannenbaum; Susan Taylor; Margaret Tempero; Masaaki Terada; Satvir Tevethia; Jean Paul Thiery; William Thilly; David Thorley-Lawson; Jay Tischfield; Robertus Tollenaar; Stephen Tomlinson; Dimitrios Trichopoulos; Elaine Trujillo; James Umen; Alex van der Eb; Wim van Egmond; Diana van Heemst; Laura van't Veer; Harold Varmus; Alexander Varshavsky; Anna Velcich; Ashok Venkitaraman; Björn Vennström; Inder Verma; Sheila Violette; Bert Volgelstein; Peter Vogt; Olga Volpert; Evan Vosburgh; Geoffrey Wahl; Graham Walker; Gernot Walter; Jack Wands; Elizabeth Ward; Jonathan Warner; Randolph Watnick; I. Bernard Weinstein; Robin Weiss; Irving Weissman; Danny Welch; H. Gilbert Welch; Zena Werb; Forest White; Michael White; Max Wicha; Walter Willet; Owen Witte; Richard Wood; Andrew Wyllie; John Wysolmerski; Michael Yaffe; Yukiko Yamashita; George Yancopoulos; Jing Yang; Moshe Yaniv; Chun-Nan Yeh; Richard Youle; Richard Young; Stuart Yuspa; Claudio Zanon; David Zaridze; Patrick Zarrinkar; Bruce Zetter; Drazen Zimonjic; Leonard Zon; Weiping Zou.

Revisores: os seguintes prestaram um grande auxílio ao revisar capítulos individuais e fazer críticas, as quais foram muito apreciadas. Sua especialidade científica e sua visão aguçada sobre clareza pedagógica se mostraram inestimáveis.

Barbara Danowski (Union College); Bob Duronio (University of North Carolina, Chapel Hill); George Edick (Rensselaer Polytechnic Institute); Hung Y. Fan (University of Carolina, Irvine); Paul G. Greenwood (Colby College); Yoji Ikawa (RIKEN, Japan); Helen James (University of East Anglia, UK); John Haanen (Netherlands Cancer Institute, The Netherlands); Momma Hejmadi (University of Bath, UK); Richard Karp (University of Cincinnati); Zhi-Chun Lai (Pennsylvania State University); Richard McIntosh (University of Colorado, Boulder); Satya Narayan (University of Florida); Peter J. Peters (Netherlands Cancer Institute, The Netherlands); Staphanie Richards (Bates College); Jeffrey E. Segall (Albert Einstein College of Medicine); A.D. Sharrocks (University of Manchester, UK); Robert Sikes (University of Delaware); Joanne Willey (Hofstra University); Jolene Windle (Virginia Commonwealth University).

Experimentadores de Aula: o teste final de um livro-texto é seu desempenho na sala de aula, e os seguintes professores e seus estudantes foram bondosos e generosos, usando capítulos deste livro em suas aulas sobre biologia do câncer. O retorno que eles deram foi extremamente útil para melhorar a clareza de exposição de muitas partes deste livro.

Iswar Hariharan (University of Carolina, Bekeley); Kunxin Luo (University of Carolina, Bekeley); G. Steven Martin (University of Carolina, Bekeley); Charles Rogler (Albert Einstein School of Medicine, Yeshiva University); Jeffrey E. Segall (Albert Einstein School of Medicine, Yeshiva University); Paula M. Vertino (Emory University School of Medicine); Jean Wang (University of California, San Diego).

Leitores: por meio da leitura cuidadosa do texto, estes dois estudantes graduados deram um retorno extremamente útil no aperfeiçoamento de muitas seções deste livro e no esclarecimento de seções que eram, em suas versões originais, mal escritas e confusas.

David Kashatus (University of North Carolina Medical School); Mark Schrampp (University of Carolina, Berkeley).

Whitehead Institute/MIT: Christine Hickey foi responsável, durante muitos anos, pela organização da enorme coleção de materiais visuais adquiridos e prestou auxílio que, pode-se dizer, foi muito além do chamado dever, de forma realmente extraordinária.

José Torradas e Ji Zhang, dois estudantes de graduação do MIT, prestaram grande auxílio na catalogação e no processamento de muitas imagens.

Dave Richardson, da biblioteca do Whitehead Institute, ajudou em incontáveis ocasiões a recuperar artigos de cantos obscuros da vasta literatura científica.

Garland: embora este livro tenha um único autor reconhecido, trata-se, na verdade, do trabalho de muitas mãos. O texto foi editado por Elizabeth Zayatz e Richard K. Mickey, dois editores que são nada menos que magníficos. Na medida em que este livro é claro e legível, muito disso é reflexo do empenho deles à clareza, precisão de linguagem, sintaxe elegante e ao uso de imagens que realmente servem para esclarecer, e não confundir. Fui muito afortunado em ter essas duas pessoas extraordinárias me acompanhando em cada passo do processo de escrita. E, sem dúvida, aprendi muito com eles.

Muitas figuras são trabalho de Nigel Orme, um ilustrador de grande talento, cujo senso de *design* e dedicação à precisão e aos detalhes são, novamente, nada menos que extraordinários.

A Garland Publishing determinou a estrutura e o projeto, e sem hesitar forneceu suporte e encorajamento ao longo de cada passo do processo de três longos anos requeridos para a sua realização. Denise Schanck deu direção e me animou em cada passo do caminho. Sempre

generosa, ela é, em todos os sentidos, uma editora magnífica, e sua inclinação natural para projetos e padrões de editoração de qualidade é um modelo. Todos os autores de livros-texto deveriam ser afortunados como eu fui de ter alguém, com as qualidades dela, no leme!

O suporte editorial e logístico necessário para organizar e montar um livro desta complexidade foi primeiramente dado por Alan Grose e depois por Sigrid Masson, os quais são multitalentosos e exemplos de competência, perfeição e prestatividade. A tarefa verdadeiramente hercúlea de obter permissões para a publicação das muitas figuras ficou sobre os ombros de Gina Pujols e Sigrid Masson. Essa ainda é uma tarefa intimidante, mesmo na era da Internet e do e-mail. Sem o auxílio delas, teria sido impossível compartilhar com o leitor muitas das imagens que criaram a área da moderna pesquisa do câncer.

O leiaute é uma dádiva do talento de Emma Jeffcock, novamente um exemplo de competência e que tem uma intuição inequívoca para tornar acessíveis e prazerosas ao leitor as imagens e as páginas que as contêm; ela também prestou um auxílio editorial muito valioso, que resultou em grandes melhorias no texto.

Uma contribuição adicional e muito valiosa na organização e no projeto foi dada por Adam Sendroff. Savita Poornam também ajudou no desenvolvimento de idéias para os materiais suplementares. O auxílio deles é reconhecido com gratidão.

Sumário

Capítulo 1	Biologia e Genética de Células e Organismos	1
Capítulo 2	A Natureza do Câncer	25
Capítulo 3	Vírus Tumoraes	57
Capítulo 4	Oncogenes Celulares	91
Capítulo 5	Fatores de Crescimento, Receptores e Câncer	119
Capítulo 6	O Circuito da Sinalização Citoplásmica Programa Muitos dos Traços de Câncer	159
Capítulo 7	Genes Supressores de Tumor	209
Capítulo 8	pRb e o Controle do Relógio do Ciclo Celular	255
Capítulo 9	p53 e Apoptose: Guardião e Executor	307
Capítulo 10	Vida Eterna: Imortalização Celular e Tumorigênese	357
Capítulo 11	Tumorigênese de Múltiplas Etapas	399
Capítulo 12	Manutenção da Integridade Genômica e o Desenvolvimento de Câncer	463
Capítulo 13	O Diálogo Substitui o Monólogo: Interações Heterotípicas e a Biologia da Angiogênese	527
Capítulo 14	Expandindo-se: Invasão e Metástase	587
Capítulo 15	Controle Populacional: Imunologia Tumoral e Imunoterapia	655
Capítulo 16	Tratamento Racional do Câncer	725
	Abreviaturas	797
	Glossário	801
	Índice	813

Sumário Detalhado

Capítulo 1

Biologia e Genética de Células e Organismos

- 1.1 Mendel estabelece as leis básicas da genética
- 1.2 A genética mendeliana ajuda a explicar a evolução darwiniana
- 1.3 A genética mendeliana rege o modo como os genes e os cromossomos se comportam
- 1.4 Os cromossomos estão alterados na maioria dos tipos de células cancerosas
- 1.5 As mutações que causam câncer ocorrem tanto na linhagem germinativa como na somática
- 1.6 O genótipo incorporado nas sequências de DNA cria o fenótipo por meio das proteínas
- 1.7 Os padrões de expressão gênica também controlam o fenótipo
- 1.8 Os fatores de transcrição controlam a expressão gênica
- 1.9 Os metazoários são formados por componentes conservados durante imensos períodos do tempo evolutivo
- 1.10 As técnicas de clonagem gênica revolucionaram o estudo das células normais e malignas

Capítulo 2

A Natureza do Câncer

- 2.1 Tumores surgem a partir de tecidos normais
- 2.2 Os tumores surgem a partir de vários tipos celulares especializados ao longo do corpo
- 2.3 Alguns tipos de tumores não se encaixam nas principais classificações
- 2.4 Os cânceres parecem se desenvolver progressivamente
- 2.5 Tumores são crescimentos monoclonais
- 2.6 Cânceres ocorrem com vastas frequências diferentes em populações humanas distintas
- 2.7 Os riscos de cânceres frequentemente parecem estar aumentados por influências transferíveis, incluindo o estilo de vida
- 2.8 Agentes químicos específicos podem induzir o câncer
- 2.9 Tanto carcinogênicos físicos como químicos atuam como mutagênicos
- 2.10 Mutagênicos podem ser responsáveis por alguns cânceres humanos
- 2.11 Sinopse e perspectivas
 - Conceitos-chave
 - Questões elaboradas
 - Leitura adicional

Capítulo 3

Vírus Tumorais

- 3.1 Peyton Rous descobre um vírus do sarcoma em galinhas

- 3.2 A descoberta de que o vírus do sarcoma de Rous tem a capacidade de transformar células infectadas em cultura
- 3.3 A presença contínua de RSV é necessária para manter a transformação
- 3.4 Vírus contendo moléculas de DNA também são capazes de induzir câncer
- 3.5 Vírus tumorais induzem mudanças múltiplas no fenótipo celular, incluindo aquisição de tumorigenicidade
- 3.6 Genomas de vírus tumorais persistem em células transformadas por vírus por tornarem-se parte do DNA celular do hospedeiro
- 3.7 Genomas retrovirais tornam-se integrados aos cromossomos de células infectadas
- 3.8 Uma versão do gene *src* de RSV também está presente em células não-infectadas
- 3.9 RSV utiliza um gene celular raptado para transformar células
- 3.10 O genoma de vertebrados carrega um grande grupo de proto-oncogenes
- 3.11 Retrovírus de transformação lenta ativam proto-oncogenes ao inserir seus genomas de modo adjacente a estes genes celulares
- 3.12 Alguns retrovírus carregam oncogenes naturalmente
- 3.13 Sinopse e perspectivas
 - Conceitos-chave
 - Questões elaboradas
 - Leitura adicional

Capítulo 4

Oncogenes Celulares

- 4.1 Os cânceres podem ser desencadeados pela ativação de retrovírus endógenos?
- 4.2 A transfecção do DNA fornece uma estratégia para detectar oncogenes não-virais
- 4.3 Os oncogenes descobertos nas linhagens de células tumorais humanas estão relacionados com aqueles carregados pelos retrovírus transformantes
- 4.4 Pró-oncogenes podem ser ativados por mudanças genéticas que afetam ou a expressão da proteína ou a sua estrutura
- 4.5 Variações de um tema: o oncogene *myc* pode surgir por via de ao menos três mecanismos adicionais distintos
- 4.6 Uma disposição diversa de alterações estruturais em proteínas também pode levar a ativação de oncogenes
- 4.7 Sinopse e perspectivas
 - Conceitos-chave
 - Questões elaboradas
 - Leitura adicional

Capítulo 5		Capítulo 7	
Fatores de Crescimento, Receptores e Câncer	119	Genes Supressores de Tumor	209
5.1 Células normais de metazoários controlam a vida umas das outras.	120	7.1 Experimentos de fusão celular indicam que o fenótipo cancerígeno é recessivo	210
5.2 A proteína Src funciona como tirosina cinase	123	7.2 A natureza recessiva do fenótipo da célula cancerígena requer uma explicação genética	213
5.3 O receptor EGF funciona como tirosina cinase	126	7.3 O tumor retinoblastoma fornece uma solução para o “quebra-cabeça” genético dos genes supressores de tumor	214
5.4 Um receptor de fator de crescimento alterado pode atuar como uma oncoproteína	129	7.4 Células de câncer incipientes inventam modos de eliminar cópias tipo selvagem de genes supressores de tumor	216
5.5 Um gene de fator de crescimento pode se tornar um oncogene: o caso de <i>sí</i> s	132	7.5 O gene <i>Rb</i> frequentemente sofre perda de heterozigosidade em tumores	219
5.6 A transfosforilação é a base da operação de receptores tirosina cinase	135	7.6 Eventos de perda de heterozigosidade podem ser usados para encontrar genes supressores de tumor	221
5.7 Também outros receptores permitem com que células de mamíferos comuniquem-se com seu ambiente	141	7.7 Muitos cânceres familiares podem ser explicados pela herança de genes supressores de tumor mutantes	224
5.8 Receptores de integrina sentem a associação entre a célula e sua matriz extracelular	147	7.8 Metilação de promotor representa um importante mecanismo para inativação de genes supressores de tumor	226
5.9 A proteína Ras, um componente aparente da cascata de sinalização <i>downstream</i> , atua como proteína G	150	7.9 Genes supressores de tumor e proteínas funcionam de diversas maneiras	232
5.10 Sinopse e perspectivas	153	7.10 A proteína NF1 age como um regulador negativo da sinalização da Ras	233
Conceitos-chave	156	7.11 Apc facilita egresso de células de criptas do cólon	235
Questões elaboradas	158	7.12 Doença de Von Hippel-Lindau: pVHL modula a resposta hipóxica	241
Leitura adicional	158	7.13 Sinopse e perspectivas	247
		Conceitos-chave	252
		Questões elaboradas	253
		Leitura adicional	253
Capítulo 6		Capítulo 8	
O Circuito da Sinalização Citoplásmica		pRb e o Controle do Relógio do Ciclo Celular	255
Programa Muitos dos Traços de Câncer	159		
6.1 Uma rota de sinalização vai desde a superfície celular até o núcleo	161	8.1 Sinais externos influenciam a decisão de uma célula de entrar no ciclo celular ativo	256
6.2 A proteína Ras está no meio de uma complexa cascata de sinalização	164	8.2 Células decidem entre crescimento e quiescência durante um período específico na fase G ₁	261
6.3 A fosforilação de tirosina controla a localização e, portanto, as ações de muitas proteínas sinalizadoras citoplasmáticas	165	8.3 Ciclinas e cinases dependentes de ciclinas constituem os componentes centrais do relógio do ciclo celular	262
6.4 Grupos SH2 explicam como receptores de fator de crescimento ativam Ras e adquirem especificidade de sinalização	171	8.4 Complexos ciclina-CDK também são regulados por inibidores de CDK	268
6.5 Uma cascata de cinases forma uma de três importantes rotas de sinalização <i>downstream</i> de Ras	173	8.5 Oncoproteínas virais revelam como a pRb bloqueia o avanço pelo ciclo celular	273
6.6 Uma segunda rota <i>downstream</i> de Ras controla lipídeos inositol e a cinase Akt/PKB	176	8.6 A pRb é disponibilizada pelo relógio do ciclo celular para servir como uma guardiã do portão do ponto de restrição	277
6.7 Uma terceira rota regulada por Ras age a partir de Ral, um primo distante de Ras	183	8.7 Fatores de transcrição E2F permitem à pRb decidir entre crescer e permanecer quiescente	278
6.8 A rota Jak-STAT permite que sinais sejam transmitidos da membrana plasmática diretamente para o núcleo	184	8.8 Várias rotas de sinalização mitogênicas controlam o estado de fosforilação de pRb	282
6.9 Receptores de adesão celular emitem sinais que convergem com aqueles liberados por receptores de fator de crescimento	186	8.9 A oncoproteína Myc perturba a decisão de fosforilar a pRb afetando o controle da progressão do ciclo celular	284
6.10 A rota Wnt- β -catenina contribui para proliferação celular	188	8.10 O TGF- β impede a fosforilação de pRb e assim bloqueia a progressão do ciclo celular	288
6.11 Receptores acoplados à proteína G também podem dirigir a proliferação normal e neoplástica	191		
6.12 Quatro outras rotas de sinalização contribuem de várias formas para a proliferação normal e neoplástica	193		
6.13 Sinopse e perspectivas	197		
Conceitos-chave	204		
Questões elaboradas	207		
Leitura adicional	207		

8.11	A função da pRb e os controles da diferenciação estão intimamente ligados	292	10.4	A proliferação de células em cultura também é limitada pelos telômeros de seus cromossomos	368
8.12	O controle da função de pRb é perturbado na maioria se não em todos os tipos de cânceres humanos	296	10.5	Os telômeros são estruturas moleculares complexas que não são replicadas facilmente	373
8.13	Sinopse e perspectivas	300	10.6	Células cancerosas incipientes podem escapar da crise por meio da expressão de telomerase	376
	Conceitos-chave	304	10.7	A telomerase exerce um papel-chave na proliferação de células cancerosas humanas	381
	Questões elaboradas	305	10.8	Algumas células imortalizadas podem manter telômeros sem a telomerase	383
	Leitura adicional	305	10.9	Os telômeros exercem papéis diferentes nas células de camundongos de laboratório e em células humanas	386
Capítulo 9			10.10	Camundongos telomerase-negativos mostram tanto suscetibilidade diminuída quanto aumentada ao câncer	388
p53 e Apoptose: Guardião e Executor			10.11	Os mecanismos que fundamentam a patogênese de câncer em camundongos telomerase-negativos também podem atuar durante o desenvolvimento de tumores humanos	392
9.1	Papovavírus leva à descoberta de p53	307	10.12	Sinopse e perspectivas	393
9.2	A descoberta de p53 como um gene supressor de tumor	308		Conceitos-chave	397
9.3	Versões mutantes de p53 interferem na função normal da proteína	310		Questões elaboradas	398
9.4	Moléculas de proteína p53 geralmente têm meia-vida curta	311		Leitura adicional	398
9.5	Uma variedade de sinais causa a indução de p53	314	Capítulo 11		
9.6	Danos ao DNA e sinais de crescimento desregulados causam estabilização de p53	315	Tumorigênese de Múltiplas Etapas		
9.7	A batalha de Mdm2 e ARF sobre o destino de p53	317	11.1	A maioria dos cânceres humanos se desenvolve ao longo de várias décadas	400
9.8	ARF e a apoptose mediada por p53 protegem contra o câncer por meio do monitoramento da sinalização intracelular	318	11.2	Histopatologia proporciona evidências da formação de tumor em múltiplas etapas	403
9.9	p53 atua como um fator de transcrição que pára o avanço do ciclo celular em resposta ao dano no DNA e que tenta auxiliar no processo de reparo	323	11.3	Os crescimentos no cólon acumulam alterações genéticas ao longo da progressão do tumor	408
9.10	p53 freqüentemente conduz para o programa de morte apoptótica	325	11.4	A progressão de múltiplas etapas de tumores ajuda a explicar a polipose familiar e a área de cancerização	412
9.11	A inativação de p53 dá vantagem às células cancerosas incipientes em várias etapas na progressão do tumor	329	11.5	O desenvolvimento do câncer parece seguir as regras da evolução darwiniana	413
9.12	Alelos mutantes herdados que afetam a via de p53 predisõem a uma variedade de tumores	331	11.6	Células-tronco tumorais complicam ainda mais os modelos darwinianos de sucessão clonal e progressão de tumor	416
9.13	A apoptose é um complexo programa que, por diversas vezes, depende da mitocôndria	332	11.7	Um trajeto linear de sucessão clonal simplifica a realidade do câncer	420
9.14	Duas vias distintas de sinalização podem disparar a apoptose	334	11.8	O modelo darwiniano de desenvolvimento do tumor é difícil de ser validado experimentalmente	423
9.15	Células cancerosas inventam diversas maneiras para inativar parte ou toda a maquinaria apoptótica	342	11.9	Múltiplas linhas de evidências revelam que células normais são resistentes à transformação por um único gene mutado	424
9.16	Sinopse e perspectivas	346	11.10	A transformação normalmente requer a colaboração entre dois ou mais genes mutantes	427
	Conceitos-chave	350	11.11	Camundongos transgênicos proporcionam modelos de oncogenes colaboradores e de transformação celular de múltiplas etapas	429
	Questões elaboradas	354	11.12	As células humanas são construídas para serem altamente resistentes a imortalização e transformação	431
	Leitura adicional	355	11.13	Agentes não-mutagênicos, incluindo aqueles que favorecem a proliferação celular, fazem importantes contribuições para a tumorigênese	435
Capítulo 10			11.14	Agentes tóxicos e mitogênicos podem atuar como promotores de tumor humano	439
Vida Eterna: Imortalização Celular e Tumorigênese					
10.1	Populações celulares normais registram o número de gerações celulares separando-as de seus ancestrais no embrião jovem	357			
10.2	Células cancerosas necessitam se tornar imortais para a formação de tumores	358			
10.3	O estresse fisiológico celular impõe uma limitação na replicação	361			
		365			

11.15	Inflamações crônicas muitas vezes promovem a progressão de tumores em camundongos e humanos	441	13.2	As células que formam linhagens de células cancerosas se desenvolvem sem interações heterotípicas e desviam do comportamento de células de tumores humanos	536
11.16	A promoção de tumores dependente de inflamação opera por meio de vias de sinalização definidas	444	13.3	Tumores restabelecem tecidos lesados que não cicatrizam	537
11.17	A promoção tumoral é provavelmente um determinante crítico da taxa de progressão tumoral em vários tecidos humanos	452	13.4	Células do estroma são contribuintes ativos da tumorigênese	548
11.18	Sinopse e perspectivas	453	13.5	Os macrófagos representam participantes importantes na ativação do estroma associado ao tumor	551
	Conceitos-chave	460	13.6	As células endoteliais e os vasos que elas formam asseguram o acesso adequado dos tumores à circulação	556
	Questões elaboradas	461	13.7	Falhar na troca angiogênica é essencial para a expansão do tumor	563
	Leitura adicional	462	13.8	A troca angiogênica inicia um processo bastante complexo	567
Capítulo 12			13.9	A angiogênese é normalmente suprimida por inibidores fisiológicos	571
Manutenção da Integridade Genômica e o Desenvolvimento de Câncer			463	13.10	Certas terapias antiangiogênicas sustentam boas promessas para o tratamento do câncer
12.1	Os tecidos são organizados para minimizar o acúmulo progressivo de mutações	464	13.11	Sinopse e perspectivas	581
12.2	Células-tronco são os alvos prováveis da mutagênese que leva ao câncer	466		Conceitos-chave	585
12.3	Apoptose, bombas de drogas e mecanismos de replicação de DNA oferecem aos tecidos uma forma de minimizar o acúmulo de células-tronco mutantes	470		Questões elaboradas	585
12.4	Os genomas das células são ameaçados por erros cometidos durante a replicação do DNA	475		Leitura adicional	586
12.5	Genomas celulares estão sob ataque constante de processos bioquímicos endógenos	479	Capítulo 14		
12.6	Genomas celulares estão sob ataque ocasional de mutágenos e seus metabólitos	483	Expandindo-se: Invasão e Metástase		
12.7	Células movem estrategicamente uma variedade de defesas para proteger moléculas de DNA do ataque por mutágenos	490	14.1	Trajeto de células de câncer de um tumor primário para um local de metástase em potencial depende de uma série de passos biológicos complexos	589
12.8	Enzimas de reparo consertam o DNA que foi alterado por mutágenos	493	14.2	A colonização representa o passo mais complexo e desafiador da cascata invasão-metástase	594
12.9	Defeitos herdados no reparo por excisão de nucleotídeos, no reparo por excisão de bases e no reparo de pareamento errôneo levam a síndromes específicas de suscetibilidade a câncer	499	14.3	A transição epitelial-mesenquimal e a perda associada da expressão de E-caderina permite que células de carcinoma tornem-se invasivas	597
12.10	Diversos outros defeitos no reparo de DNA conferem suscetibilidade aumentada através de mecanismos pouco entendidos	505	14.4	A transição epitelial-mesenquimal é freqüentemente induzida por sinais do estroma	605
12.11	O cariótipo de células de câncer com freqüência é alterado por meio de alterações na estrutura cromossomal	510	14.5	EMTs são programadas por fatores de transcrição que orquestram passos-chave na embriogênese	615
12.12	O cariótipo de células cancerosas com freqüência é modificado por meio de alterações no número cromossômico	511	14.6	Proteases extracelulares desempenham papéis importantes na invasividade	619
12.13	Sinopse e perspectivas	517	14.7	Pequenas GTPases tipo-Ras controlam processos celulares incluindo adesão, forma celular e mobilidade	624
	Conceitos-chave	524	14.8	Células em metástase podem usar vasos linfáticos para sair do tumor primário	631
	Questões elaboradas	525	14.9	Vários fatores governam os locais nos órgãos em que células de câncer disseminadas formam metástases	634
	Leitura adicional	525	14.10	Metástase para o osso requer subversão de osteoblastos e osteoclastos	638
Capítulo 13			14.11	Genes supressores de metástases contribuem na regulação do fenótipo metastático	642
O Diálogo Substitui o Monólogo: Interações Heterotípicas e a Biologia da Angiogênese			527	14.12	Micrometástases ocultas ameaçam a sobrevivência de longa duração de pacientes com câncer
13.1	Tecidos epiteliais normais e neoplásicos são formados a partir de tipos celulares interdependentes	530	14.13	Sinopse e perspectivas	646
				Conceitos-chave	652
				Questões elaboradas	653
				Leitura adicional	653

Capítulo 15

Controle Populacional: Imunologia Tumoral e Imunoterapia

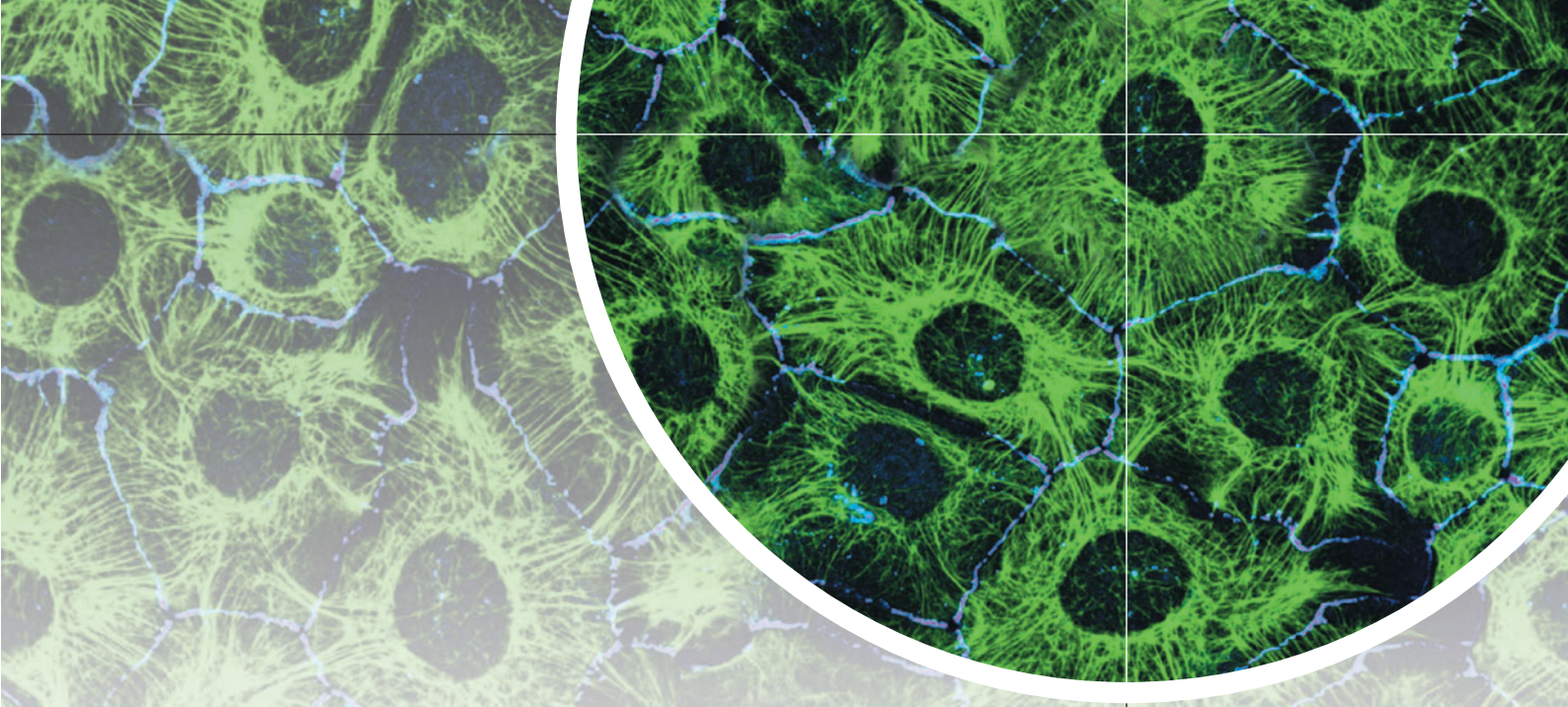
15.1	O sistema imune funciona de maneiras complexas para destruir agentes estranhos invasores e células anormais nos tecidos do corpo	655
15.2	A resposta imune adaptativa leva à produção de anticorpos	656
15.3	Outro tipo de resposta imune adaptativa leva à formação de células citotóxicas	659
15.4	A resposta imune inata não depende de sensibilização prévia	663
15.5	A necessidade de distinguir o “próprio” do “não-próprio” resulta em tolerância imunológica	666
15.6	Células T regulatórias são capazes de suprimir componentes maiores da resposta imune adaptativa	668
15.7	A teoria da imunovigilância e suas limitações	669
15.8	O uso de camundongos geneticamente modificados leva ao ressurgimento da teoria da imunovigilância	669
15.9	O sistema imune humano exerce um papel crucial na eliminação de vários tipos de câncer	673
15.10	Diferenças sutis entre tecidos normais e tecidos neoplásicos podem permitir que o sistema imune seja capaz de distingui-los	675
15.11	O reconhecimento imune de tumores pode ser retardado até estágios avançados da progressão tumoral	681
15.12	Antígenos de transplantação específicos de tumores freqüentemente provocam uma resposta imune potente	683
15.13	Antígenos de transplantação associados a tumores também podem ativar a imunidade antitumoral	685
15.14	Células tumorais podem escapar da detecção do sistema imune pela supressão da expressão de antígenos de superfície	687
15.15	Células tumorais se protegem dos mecanismos de defesa mediados por células matadoras naturais	689
15.16	Células tumorais ativam um contra-ataque sobre os imunócitos	695
15.17	Células tumorais se tornam intrinsecamente resistentes a várias formas de eliminação usadas pelo sistema imune	697
15.18	Células tumorais atraem células T regulatórias para se defender do ataque de outros linfócitos	701
15.19	A imunização passiva com Herceptina pode ser usada para matar células de câncer de mama	703
15.20	A imunização passiva com anticorpos pode ser usada para tratar tumores de células B	704
15.21	A imunização passiva pode ser obtida pela transferência de imunócitos de um indivíduo para outro	708
		713

15.22	Os sistemas imunes dos pacientes podem ser mobilizados para atacarem seus tumores	714
15.23	Sinopse e perspectivas	720
	Conceitos-chave	722
	Questões elaboradas	723
	Leitura adicional	724

Capítulo 16

Tratamento Racional do Câncer

		725
16.1	O desenvolvimento e o uso clínico de terapias efetivas dependerão do diagnóstico acurado da doença	727
16.2	Drogas anticâncer bem-sucedidas podem trazer à tona várias respostas a partir de células tumorais	732
16.3	Considerações funcionais ditam que apenas um subgrupo de proteínas defectivas nas células cancerosas é alvo atrativo para o desenvolvimento de drogas	734
16.4	A bioquímica de proteínas também determina se elas são alvos atrativos para intervenção	737
16.5	Químicos farmacêuticos podem gerar e explorar as propriedades bioquímicas de um amplo arranjo de drogas em potencial	744
16.6	Candidatos a drogas devem ser testados em modelos celulares como uma medida inicial da sua utilidade em organismos inteiros	747
16.7	Estudos sobre a ação de drogas em animais de laboratório são parte essencial dos testes pré-clínicos	748
16.8	Drogas candidatas promissoras devem ser submetidas a testes clínicos rigorosos e abrangentes nos testes de Fase I em humanos	751
16.9	Testes de Fases II e III fornecem indicações creditáveis sobre a eficácia clínica	752
16.10	Tumores freqüentemente desenvolvem resistência a terapias inicialmente efetivas	755
16.11	O desenvolvimento do Gleevec ladrilhou o caminho para o desenvolvimento de vários outros compostos-alvo	757
16.12	Antagonistas aos receptores EGF podem ser úteis para tratar uma grande variedade de tipos de tumores	765
16.13	Inibidores de proteassomas geram benefícios terapêuticos inesperados	769
16.14	Um teratôgeno para ovelhas pode ser útil como droga anticâncer altamente potente	776
16.15	mTOR, o principal regulador da fisiologia celular, representa um alvo atrativo para a terapia anticâncer	782
16.16	Sinopse e perspectivas: desafios e oportunidades no caminho adiante	787
	Conceitos-chave	794
	Questões elaboradas	795
	Leitura adicional	795



CAPÍTULO 1

Biologia e Genética de Células e Organismos

“O protoplasma, simples ou nucleado, é a base formal de toda a vida... Portanto, fica claro que todas as forças viventes são cognatas, e que todas as formas de vida são fundamentalmente de um único tipo. As pesquisas dos químicos têm revelado uma uniformidade não menos impressionante na composição material da matéria viva.”

Thomas Henry Huxley, biólogo evolutivo, 1868

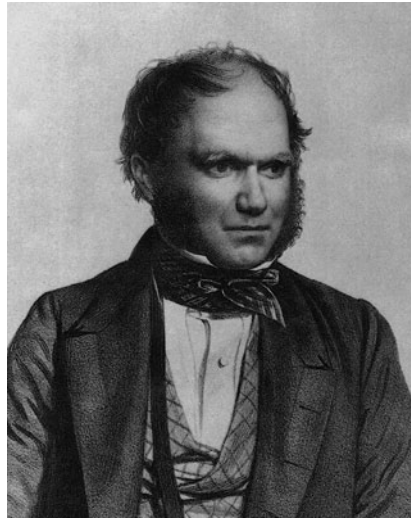
“Qualquer coisa verdadeira em *E. coli* deve também ser verdadeira nos elefantes.”

Jacques Monod, biólogo molecular pioneiro, 1954

A revolução biológica do século XX remodelou completamente todas as áreas dos estudos biomédicos, sendo a pesquisa do câncer apenas uma delas. Os frutos dessa revolução foram revelações tanto das linhas gerais como de detalhes profundos de genética e hereditariedade, de como as células se multiplicam e dividem, de como elas se associam para formar tecidos e de como os tecidos se desenvolvem sob o controle de genes específicos. Tudo no texto a seguir provém direta ou indiretamente desse novo conhecimento.

Essa revolução, que começou no meio do século e foi provocada pela descoberta da dupla hélice de DNA por Watson e Crick, continua até hoje. Na verdade, ainda estamos muito próximos desse avanço significativo para compreender precisamente sua real importância e suas ramificações a longo prazo. A disciplina de biologia molecular, que se desenvolveu em seguida a essa descoberta, trouxe soluções ao problema mais profundo da biologia do século XX – como a constituição genética de uma célula e de um organismo determinam sua forma e função?

Figura 1.1 Darwin e Mendel (A) A publicação de *On The Origin of Species by Means of Natural Selection* por Charles Darwin, em 1859, exerceu um efeito profundo no pensamento sobre a origem da vida, a evolução da complexidade dos organismos e o parentesco das espécies. (B) A teoria da evolução de Darwin não tinha uma fundamentação genética até o trabalho de Gregor Mendel. A síntese entre evolução darwiniana e genética mendeliana é a base de muito do moderno pensamento biológico. (A, da Coleção Grace K. Babson de Obras de Sir Isaac Newton, em exposição permanente no Dibner Institute e Burndy Library, Cambridge, MA; B, cortesia do Mendelianum Museum Moraviae, Brno, República Checa.)



(A)



(B)

Sem essa base molecular, a moderna pesquisa do câncer, assim como outras disciplinas biológicas, teriam permanecido uma ciência descritiva limitada a catalogar diversos fenômenos biológicos, sem saber explicar a mecânica de como ocorrem. Hoje, nossa compreensão de como os cânceres se originam está sendo continuamente melhorada por descobertas em diversos campos da pesquisa biológica, a maioria das quais realizada nas ciências da biologia molecular e genética. Talvez de forma inesperada, muitos dos conhecimentos acerca da origem das doenças malignas não estão vindo das bancadas de laboratório de pesquisadores do câncer. Em vez disso, o estudo de diversos organismos, desde leveduras a vermes e moscas, abastece-nos do capital intelectual que alimenta a próxima idéia fundamental na rápida e movimentada área de pesquisa do câncer.

Os que inspiraram essa revolução biológica se apoiaram sobre os ombros de gigantes do século XIX, especificamente, Darwin e Mendel (Figura 1.1). Sem os conceitos estabelecidos por ambos, que influenciaram todos os aspectos do moderno pensamento biológico, a biologia molecular e a pesquisa contemporânea do câncer seriam inconcebíveis. Dessa forma, ao longo deste capítulo, faremos freqüente referência a processos evolutivos, como propostos por Charles Darwin, e a sistemas genéticos, como concebidos por Gregor Mendel.

1.1 Mendel estabelece as leis básicas da genética

Muitas das leis básicas da genética, que regem a forma como os genes são passados de um organismo complexo ao outro, foram descobertas no século XIX e chegaram até nós basicamente inalteradas. Trabalhando na década de 1860, Gregor Mendel expôs essas leis e descreveu como elas afetam a forma e o comportamento de organismos individuais. O trabalho de Mendel enfocava principalmente a genética de plantas de ervilha. Seus resultados e suas conclusões foram logo esquecidos, sendo redescobertos independentemente por três pesquisadores somente em 1900. Durante a década seguinte, ficou claro que essas leis – agora chamadas de genética mendeliana – se aplicam a virtualmente todos os organismos sexuais, inclusive **metazoários** (animais multicelulares) e **metáfitos** (plantas multicelulares).

A argúcia fundamental de Mendel veio de sua percepção de que a informação genética é passada em forma de partícula de um organismo para sua descendência. Isso implicava que o repertório completo da informação genética transportado por um organismo, agora chamado de seu “genoma”, está organizado como uma coleção de pacotes distintos e separáveis de informação, os quais viriam a ser chamados de *genes*. Apenas recentemente passamos a saber, com precisão, como muitos genes diferentes estão presentes nos genomas de mamíferos; as atuais análises do genoma humano – o melhor estudado entre esses – sugerem o número na

	Forma da semente	Cor da semente	Cor da flor	Posição da flor	Forma da vagem	Cor da vagem	Altura da planta
Primeira forma do caráter (dominante)	redonda	amarela	violeta-vermelha	axial	inflada	verde	alta
Segunda forma do caráter (recessivo)	rugosa	verde	branca	terminal	constrita	amarela	baixa

faixa de 22.000, um pouco mais que os 19.000 genes identificados no genoma da mosca-das-frutas *Drosophila melanogaster*.

O trabalho de Mendel também implicava que a constituição de um organismo, inclusive sua estrutura física e química, poderia ser dividida em uma série de entidades distintas, separáveis. (É claro que essa separabilidade está implícita na forma com que usamos a linguagem para descrever formas anatômicas e funções – palavras diferentes para descrever nariz, braço e estômago.) Mendel foi além, ao mostrar que diferentes partes anatômicas são controladas por genes diferentes. Ele descobriu que o material herdável que controla a lisura das ervilhas agia independentemente do material que controla a altura da planta ou a cor da flor. Na realidade, cada característica observável de um indivíduo podia ser atribuída a um gene separado, que servia como seu anteprojeto. Assim, a pesquisa de Mendel implicava que a constituição genética de um organismo (seu **genótipo**) poderia ser dividida em centenas ou, talvez, milhares de pacotes distintos de informação; paralelamente, sua forma observável, externa (seu **fenótipo**) poderia ser subdividida em um grande número de características físicas ou químicas distintas (Figura 1.2).

O modo de pensar de Mendel iniciou projetos de pesquisa que duraram um século entre os geneticistas, que aplicaram seus princípios ao estudo de milhares de caracteres em vários animais experimentais, como moscas (*D. melanogaster*), vermes (*Caenorhabditis elegans*) e camundongos (*Mus musculus*). Na metade do século XX, os geneticistas também começaram a aplicar os princípios mendelianos ao estudo do comportamento genético de organismos unicelulares, como a bactéria *Escherichia coli* e a levedura do pão *Saccharomyces cerevisiae*. O princípio do genótipo controlando o fenótipo foi diretamente transferido a esses organismos mais simples e seus sistemas genéticos.

Embora a genética mendeliana represente o fundamento da genética contemporânea, ela foi adaptada e expandida em inúmeras formas desde sua concepção, em 1865 e 1900. Por exemplo, o fato de que os organismos unicelulares em geral se reproduzem assexuadamente, isto é, sem cruzamento, criou uma necessidade de adaptação das leis originais de Mendel. Além disso, percebeu-se que a noção de que cada atributo de um organismo poderia ser devido a

Figura 1.2 A informação genética é organizada em pacotes distintos Uma das revelações fundamentais de Gregor Mendel foi que o conteúdo genético de um organismo consiste em pacotes distintos de informação, cada um responsável por uma diferente característica observável do organismo. Aqui estão mostrados sete caracteres da planta de ervilha, cujo comportamento Mendel estudou por meio de experimentos de cruzamento. Em cada caso, um dado caráter poderia ter duas manifestações fenotípicas alternativas, que hoje sabemos ser especificadas por versões alternativas de genes, as quais denominamos alelos. Quando os dois alelos alternativos coexistiam em uma mesma planta, um desses caracteres (que hoje denominamos “dominante”) era sempre observado, enquanto o outro (o caráter “recessivo”) não era observado. (Cortesia de J. Postlethwait.)

instruções transportadas por um único gene era simplista. A grande maioria dos caracteres observáveis de um organismo pode ser atribuída a interações cooperativas entre muitos genes. Inversamente, quase todos os genes transportados no genoma de um organismo complexo desempenham funções no desenvolvimento e na manutenção de múltiplos órgãos, tecidos e processos fisiológicos.

A genética mendeliana revelou, pela primeira vez, que a informação genética é transportada de forma redundante nos genomas de plantas e animais complexos. Mendel deduziu que existiam duas cópias de um gene para cor da flor e duas para forma da ervilha. Hoje sabemos que essa dupla redundância se aplica a todo o genoma, com exceção dos genes transportados nos cromossomos sexuais. Portanto, os genomas dos organismos superiores são denominados **diplóides**.

As observações de Mendel também indicavam que as duas cópias de um gene poderiam carregar informações diferentes e potencialmente conflitantes. Assim, uma cópia do gene poderia especificar ervilhas com a superfície rugosa, e a outra, ervilhas com a superfície lisa. No século XX, essas versões diferentes de um gene viriam a ser chamadas de **alelos**. Um organismo pode transportar dois alelos idênticos de um gene, situação em que, com respeito a esse gene, é chamado de **homozigoto**. Inversamente, a presença de dois alelos diferentes de um gene no genoma de um organismo faz deste um **heterozigoto** com respeito a esse gene.

Como os dois alelos de um gene podem carregar instruções conflitantes, nossa visão de como o genótipo determina o fenótipo se tornou mais complicada. Mendel descobriu que, em muitos casos, a expressão de um alelo pode prevalecer sobre a do outro, determinando a forma final de uma característica. Por exemplo, um genoma de ervilha pode ser heterozigoto para o gene que determina a forma das ervilhas, transportando um alelo liso e um rugoso. Contudo, a planta de ervilha transportando esse par de alelos produzirá, invariavelmente, ervilhas lisas. Isso indica que o alelo liso é **dominante**, e que ele invariavelmente anulará seu alelo complementar **recessivo** (rugoso) na determinação do fenótipo (veja a Figura 1.2). (A rigor, usando a terminologia genética correta, diríamos que um fenótipo codificado por um gene é dominante em relação ao outro, sendo este último recessivo.)

A pesquisa genética do século XX revelou outras sutilezas relativas ao modo como os alelos de um gene interagem entre si. Frequentemente as “expressões” de dois alelos conflitantes se misturam na determinação do resultado – elas procuram um meio-termo entre suas mensagens discrepantes. Por exemplo, um par coexistente de alelos vermelhos e brancos no gene que determina a cor das flores em bocas-de-leão produzirá um fenótipo rosa (Figura 1.3). Isso representa um exemplo de **dominância incompleta**. Em outras situações, as expressões de ambos os alelos são claramente detectadas – o fenômeno da **co-dominância**. Assim, indivíduos que são heterozigotos para o loco genético que determina o tipo sanguíneo (p. ex., alelos A e B) possuirão hemácias que expressam tanto os antígenos A como B.

1.2 A genética mendeliana ajuda a explicar a evolução darwiniana

No início do século XX, não era evidente como as diferentes versões alélicas de um gene surgiam. Em princípio, essa variabilidade no conteúdo da informação parecia estar presente no reservatório coletivo de genes de uma espécie desde seus remotos primórdios evolutivos. Essa percepção mudou apenas mais tarde, inicialmente nas décadas de 1920 e 1930, quando ficou evidente que a informação genética é corrompível; o conteúdo da informação nos textos genéticos, como em todos os textos, pode ser alterado. Descobriu-se que as **mutações** eram responsáveis pela mudança do conteúdo da informação de um gene, desse modo convertendo um alelo em outro ou criando um novo alelo a partir de um previamente difundido em uma espécie. Um alelo presente na grande maioria dos indivíduos de uma espécie é geralmente denominado **tipo selvagem**, implicando o termo que tal alelo, naturalmente presente em um grande número de organismos aparentemente saudáveis, é compatível com a estrutura e a função normais.

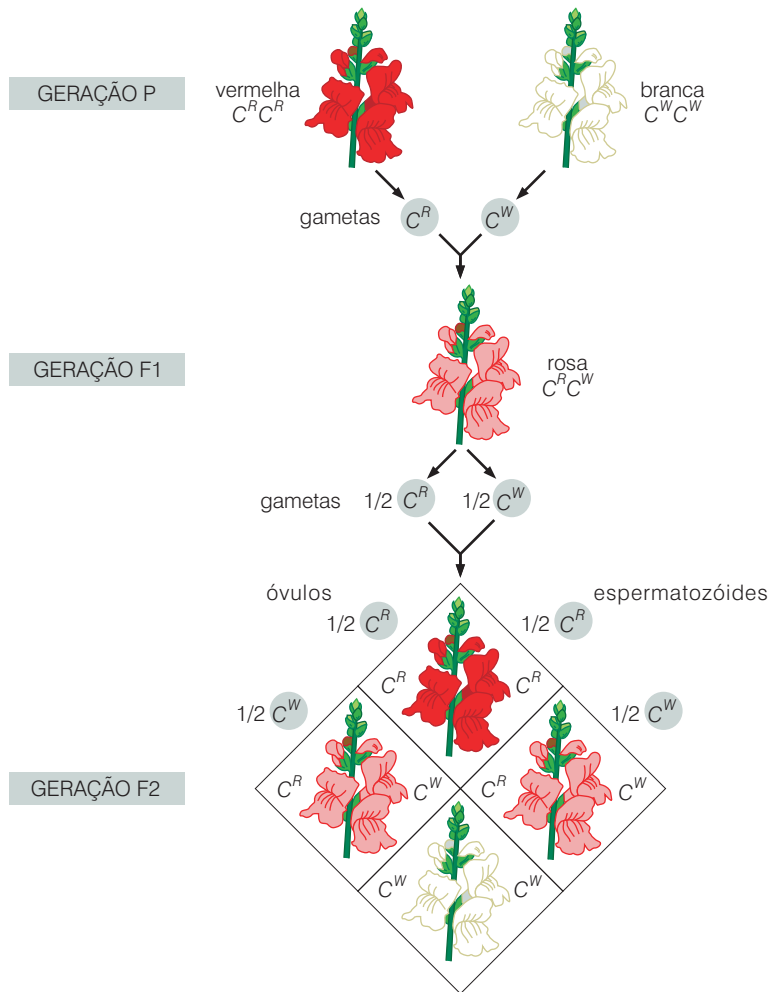


Figura 1.3 Alelos incompletamente dominantes Embora Mendel tenha estudado uma série de genes que transportam somente alelos dominantes e recessivos, muitos genes funcionam de forma mais complexa, de modo que ambos os alelos contribuem para o fenótipo – o fenômeno da dominância incompleta. Como aqui indicado, se bocas-de-leão que possuem flores vermelhas e brancas forem cruzadas entre si, a descendência inicial na geração F1 desenvolverá flores rosas. Essas bocas-de-leão rosas são geneticamente heterozigotas, e se, como aqui indicado, forem cruzadas entre si, na segunda geração aparecerão homozigotos que, novamente, portarão flores vermelhas ou brancas. (Adaptada de N. Campbell, Biology, 4th ed. San Francisco, CA: Benjamin Cummings, 1996.)

As mutações alteram continuamente os genomas ao longo da expectativa de vida evolutiva de uma espécie, que geralmente se estende por milhões de anos. Elas atacam aleatoriamente o genoma e os genes que o constituem. As mutações fornecem a uma espécie um método de continuamente mexer com seu genoma, de experimentar novas versões de genes que oferecem a perspectiva de fenótipos novos e potencialmente melhorados. O resultado da contínua chuva de mutações sobre o genoma é o progressivo aumento, durante a história evolutiva de uma espécie, da diversidade genética de seus membros. Assim, o conjunto de alelos presente nos genomas de todos os membros de uma espécie – o **reservatório de genes** dessa espécie – se torna progressivamente mais heterogêneo à medida que a espécie envelhece.

Isso significa que espécies mais antigas transportam mais alelos diferentes em seus genomas do que as mais jovens. Os humanos, que pertencem a uma espécie relativamente jovem (< 150.000 anos), possuem metade dos alelos e da diversidade genética dos chimpanzés, os quais, portanto, existem como espécie o dobro do tempo que nós.

A contínua diversificação de alelos no genoma de uma espécie, que ocorre por milhões de anos, é contrabalançada, até certo ponto, pelas forças da seleção natural originalmente descritas por Charles Darwin. Alguns alelos de um gene podem conferir fenótipos mais vantajosos do que outros, de forma que os organismos individuais que carregam esses alelos vantajosos têm uma maior probabilidade de deixar descendentes, em maior número, do que outros membros da mesma espécie que, por acaso, não carregam esses alelos. Consequentemente, a seleção natural resulta em um contínuo descarte de muitos alelos que foram gerados por mutações aleatórias. A longo prazo, sendo as condições iguais, os alelos desvantajosos se perdem do reservatório de alelos transportados pelos

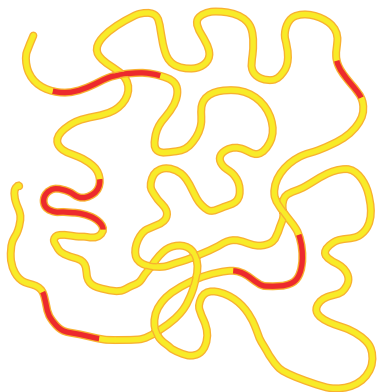


Figura 1.4 Seqüências biologicamente importantes no genoma humano O genoma humano pode ser representado como um conjunto de ilhas relativamente pequenas de seqüências biologicamente importantes (~3,5% do genoma total; *vermelho*) que flutuam em meio a um mar de DNA "lixo" (*amarelo*). A proporção de seqüências que carregam a informação biológica foi bastante exagerada nesta ilustração.

membros de uma espécie, os alelos vantajosos aumentam seu número e a aptidão global da espécie melhora substancialmente.

Hoje, um século depois da redescoberta de Mendel e que a genética mendeliana foi restaurada, chegamos à percepção de que a grande massa da informação genética em nosso próprio genoma – na verdade, nos genomas de todos os mamíferos – não parece especificar o fenótipo e, muitas vezes, não se associa a genes específicos. Considerando a descoberta, em 1944, de que a informação genética é codificada por moléculas de DNA, esses trechos "não-codificantes" no genoma são geralmente chamados de DNA "lixo" (Figura 1.4). Somente cerca de 1,5% do DNA genômico de um mamífero transporta informação de seqüência que codifica as estruturas das proteínas. Recentes comparações de seqüência dos genomas humano, de camundongo e de cachorro sugerem que outros ~2% codificam informações importantes que regulam a expressão gênica e que medeiam outras funções ainda pouco entendidas.

Como as mutações agem ao acaso sobre um genoma, alterando genes verdadeiros e o DNA "lixo" indiscriminadamente, a grande maioria das mutações altera a informação genética – seqüências de

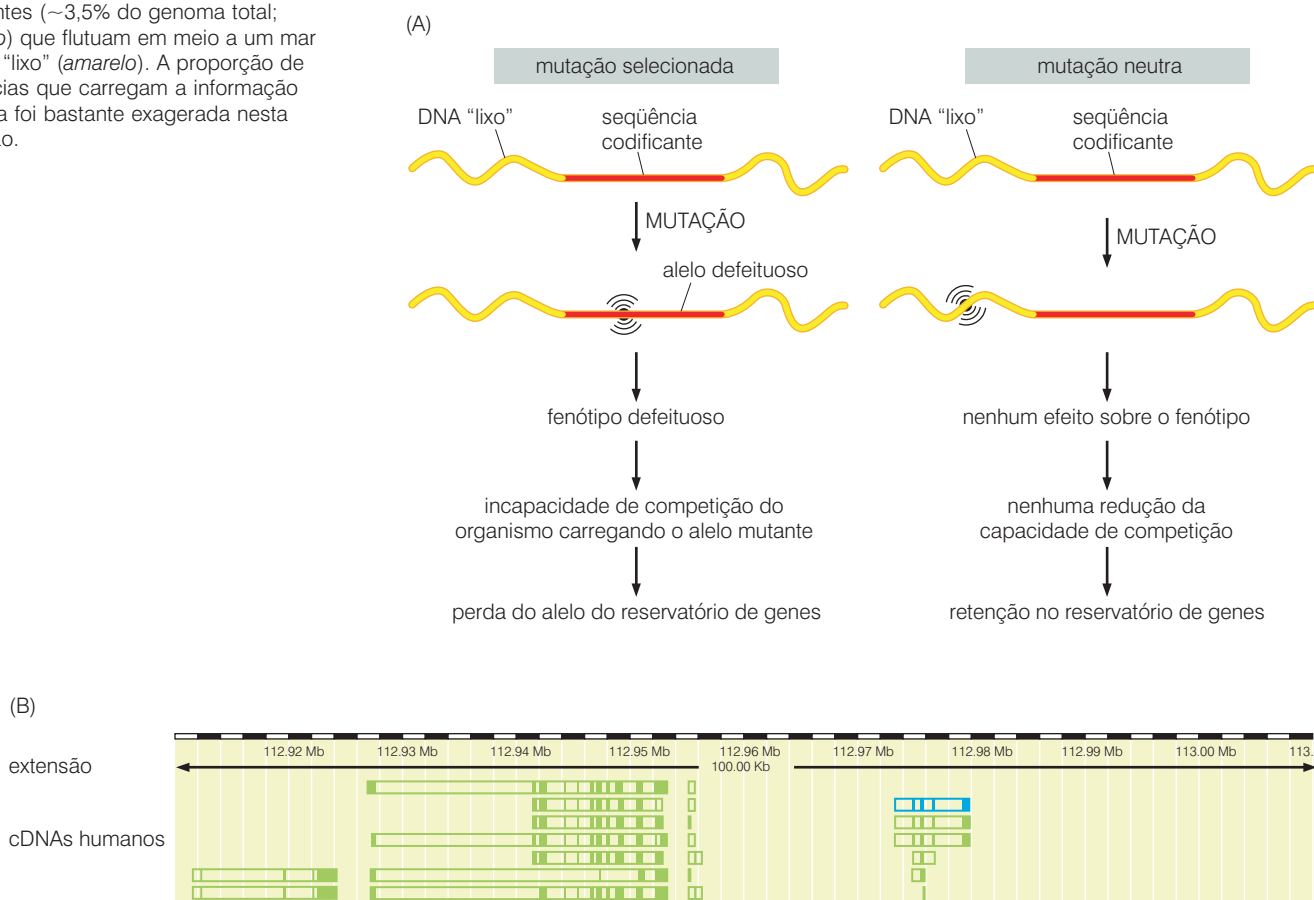
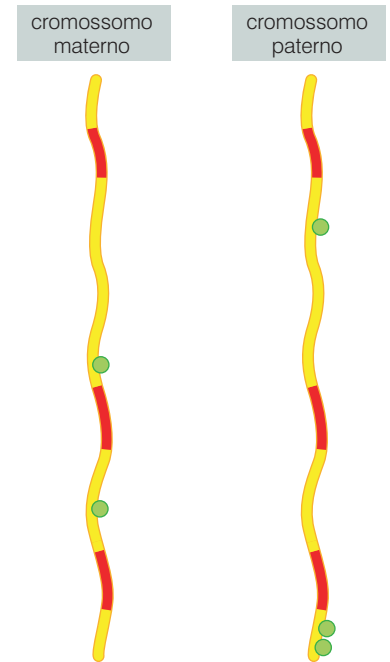


Figura 1.5 Mutações neutras e evolução (A) As seqüências codificantes (*vermelho*) da maioria dos genes já foram otimizadas ao longo de extensos períodos do tempo evolutivo. Portanto, muitas mutações que afetam a seqüência de aminoácidos e, desse modo, a estrutura protéica (*esquerda*) criam alelos que comprometem a capacidade de sobrevivência do organismo. Por isso, esses alelos mutantes são mais propensos à eliminação do reservatório de genes da espécie. Em contraste, mutações que atacam o DNA "lixo" (*amarelo*) não terão efeito sobre o fenótipo e são, portanto, em geral preservadas no reservatório de genes da espécie. Isso explica por que, ao longo de extensos períodos do tempo evolutivo, as seqüências de DNA codificante mudam lentamente, ao passo que as seqüências de DNA não-

codificante mudam muito mais rapidamente. (B) É representado o mapa físico de um segmento de 0,1 megabase, aleatoriamente escolhido, do Cromossomo 1 humano, do par de bases 112.912.286 ao par de bases 113.012.285. Quatro genes diferentes foram aqui encontrados. Cada um está separado em um pequeno número de ilhas (*retângulos cheios pequenos*), que especificam ou provavelmente especificam segmentos de moléculas de mRNA (i.e., éxons), e grandes trechos de seqüências intervenientes (i.e., íntrons), que não parecem especificar informação biológica (veja a Figura 1.17). Como fica evidente, grandes trechos da seqüência de DNA entre os genes não se encontram associados a nenhuma função biológica específica. (B, cortesia de The Wellcome Trust Sanger Institute.)

Figura 1.6 Diversidade polimórfica no reservatório de genes humanos Como a grande maioria do DNA genômico humano não codifica informação biologicamente importante (*amarelo*), ele tem evoluído relativamente rápido e acumulado muitas diferenças sutis nas seqüências – polimorfismos –, as quais são fenotipicamente silenciosas (veja a Figura 1.5). Tais polimorfismos são transmitidos como alelos mendelianos, mas sua presença em um genoma pode ser averiguada somente por meio de técnicas moleculares, como seqüenciamento de DNA. Os pontos (*verde*) indicam onde a seqüência nesse cromossomo difere da seqüência mais comum no reservatório de genes humanos. Por exemplo, a seqüência predominante em um trecho de DNA cromossômico pode ser TAACTGG, enquanto a seqüência variante TTACTGG pode ser carregada por uma minoria de seres humanos, constituindo um polimorfismo. A presença de um polimorfismo em um cromossomo, mas não no outro, representa uma região de heterozigosidade, mesmo que um gene vizinho (*vermelho*) esteja presente em versão alélica idêntica em ambos os cromossomos e esteja, portanto, em uma configuração homozigótica.



DNA – que não tem efeito sobre o fenótipo celular ou do organismo. Essas mutações permanecem fenotipicamente silenciosas e são consideradas, do ponto de vista da seleção natural, **mutações neutras**, não sendo nem vantajosas nem desvantajosas (Figura 1.5). Uma vez que os alelos criados por essas mutações são silenciosos, sua existência não pôde ser reconhecida pelos primeiros geneticistas, cujo trabalho dependia de fenótipos aferíveis. Contudo, com o advento das técnicas de seqüenciamento de DNA, ficou evidente que centenas de milhares, se não milhões, de mutações funcionalmente silenciosas se encontram espalhadas ao longo de todo o genoma de organismos como o homem. O genoma de cada ser humano carrega seu próprio arranjo único dessas alterações genéticas funcionalmente silenciosas. O termo *polimorfismo* foi originalmente usado para descrever variações no aspecto e na forma que distinguem indivíduos normais de uma espécie entre si. Atualmente, os geneticistas usam o termo **polimorfismos genéticos** para descrever as diferenças interindividuais e funcionalmente silenciosas na seqüência de DNA que tornam único o genoma de cada ser humano (Figura 1.6).

Durante o curso da evolução, os cerca de 3,5% do genoma que realmente codificam informação biológica se comportam de forma muito diferente do DNA “lixo”. As seqüências de DNA “lixo” sofrem mutações que não têm efeito sobre a viabilidade de um organismo. Conseqüentemente, inúmeras mutações nas seqüências não-codificantes do genoma de uma espécie sobrevivem em seu reservatório de genes e se acumulam progressivamente durante sua história evolutiva. As mutações que afetam as seqüências codificantes, ao contrário, em geral levam à perda de função e, como conseqüência, à perda da viabilidade do organismo; portanto, tais mutações são eliminadas do reservatório de genes pela mão da seleção natural, explicando por que as seqüências genéticas que efetivamente especificam fenômenos biológicos em geral mudam muito lentamente durante longos períodos do tempo evolutivo (veja a Barra lateral 1.1).

1.3 A genética mendeliana rege o modo como os genes e os cromossomos se comportam

Na primeira década do século XX, descobriu-se que as leis de Mendel da genética tinham um paralelo impressionante com o comportamento dos cromossomos, que estavam nessa época sendo visualizados sob o microscópio óptico. Descobriu-se que tanto os genes de Mendel como os cromossomos estavam presentes aos pares. Logo ficou claro que um conjunto idêntico de cromossomos está presente em quase todas as células de um organismo complexo. Descobriu-se que esse arranjo cromossômico, geralmente denominado **cariótipo**, se duplicava toda vez que uma célula passava por um ciclo de multiplicação e divisão.

Os paralelos entre os comportamentos de genes e cromossomos levaram à especulação, logo validada em centenas de diferentes formas, de que os misteriosos pacotes de informações denominados genes eram transportados pelos cromossomos. Percebeu-se que cada cromossomo transporta seu próprio conjunto único de genes, em um arranjo linear. Hoje, sabemos que vários milhares de genes podem ser arranjados ao longo de um cromossomo mamífero.

Barra lateral 1.1 As forças evolutivas ditam que certos genes sejam altamente conservados. Muitos genes codificam características celulares essenciais à contínua viabilidade da célula. Esses genes, como todos os outros no genoma, são suscetíveis à mão sempre ativa da mutação, que continuamente cria novas seqüências gênicas, ao mutar as que já existem. A seleção natural testa essas novas seqüências e determina se elas especificam fenótipos mais vantajosos do que os preexistentes. Quase invariavelmente, as seqüências de genes necessários à célula e, portanto, à viabilidade do organismo, já foram otimizadas há centenas de milhões de anos. Por conseqüência, quase todas as mudanças que ocorrem subseqüentemente na informação da seqüência desses genes seriam deletérias e comprometeriam a viabilidade da célula e, por sua vez, do organismo. Esses alelos mutantes foram logo perdidos, porque os organismos mutantes que os continham não deixaram descendentes. Tal dinâmica explica por que as seqüências de muitos genes foram altamente conservadas ao longo de gigantescos períodos do tempo evolutivo. Dito mais corretamente, as estruturas de suas proteínas codificadas foram muito conservadas.

Na verdade, a grande maioria das proteínas presentes em nossas próprias células e necessárias à viabilidade celular foi primeiramente desenvolvida durante a evolução dos eucariotos (células nucleadas) unicelulares. Isso é comprovado por inúmeras observações que mostram que nossas proteínas possuem equivalentes claramente reconhecíveis em eucariotos unicelulares, como a levedura do pão. Outro grande conjunto de genes e proteínas bastante conservadas pode ser relacionado ao aparecimento dos primeiros animais multicelulares (metazoários); esses genes possibilitaram o desenvolvimento de diferentes órgãos e da fisiologia dos organismos. Portanto, outro grande grupo de nossos próprios genes e proteínas está presente de forma equivalente em vermes e moscas (Figura 1.7).

Na época em que o ancestral de todos os mamíferos apareceu pela primeira vez, há mais de 150 milhões de anos, virtualmente todas as características bioquímicas e moleculares presentes nos mamíferos contemporâneos já tinham se desenvolvido. O fato de elas terem mudado pouco no tempo interveniente indica que sua otimização ocorreu muito antes do aparecimento das várias ordens de mamíferos. Isso explica por que a embriogênese, a fisiologia e a bioquímica de todos os mamíferos são muito semelhantes, tão semelhantes a ponto de as lições aprendidas com o

estudo de camundongos de laboratório serem quase sempre transferíveis à compreensão da biologia humana.

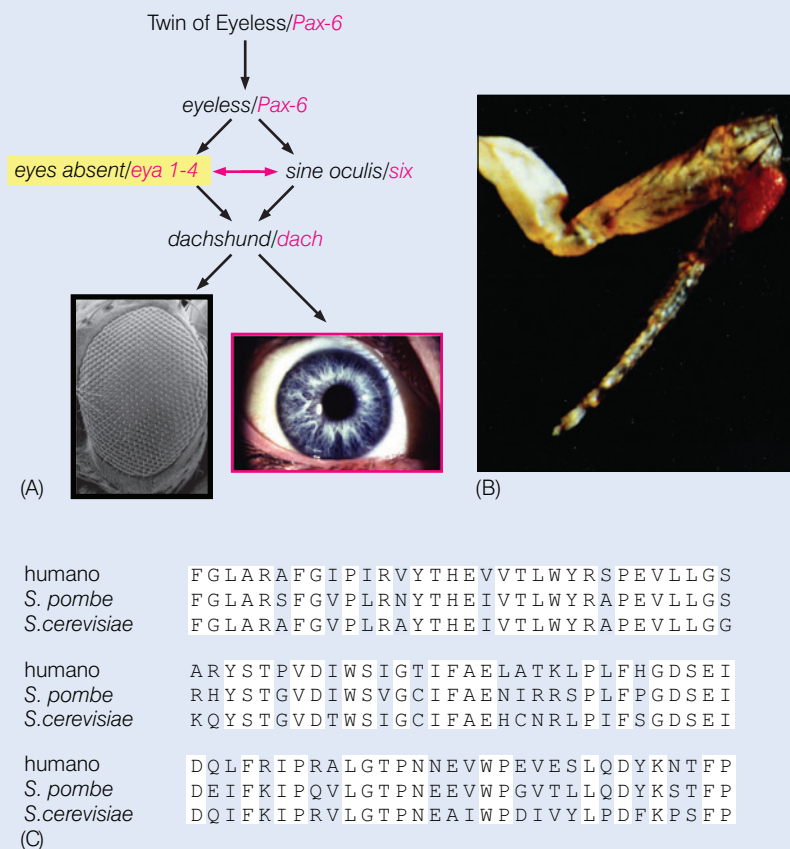


Figura 1.7 A extraordinária conservação da função gênica. O último ancestral comum a moscas e mamíferos viveu há mais de 600 milhões de anos. Além disso, os olhos da mosca (i.e., um artrópode) e os olhos de um mamífero exibem arquiteturas totalmente diferentes. Entretanto, os genes que orquestram o desenvolvimento de olhos (*eyeless*, na mosca, *Pax-6/small eye*, no camundongo) são intercambiáveis. (A) Assim, os componentes das cascatas de transdução de sinal que operam *downstream* a esses reguladores mestres, para dar início ao desenvolvimento de olhos (*preto* para moscas, *rosa* para camundongos), também são altamente conservados e intercambiáveis. (B) A expressão do gene de camundongo *Pax-6/small eye*, como o gene *eyeless* de *Drosophila*, em um local inadequado (*ectópico*) em um embrião de mosca resulta no desenvolvimento de um olho na perna da mosca, demonstrando a intercambiabilidade dos dois genes. (C) A conservação da função genética ao longo de enormes distâncias evolutivas muitas vezes se manifesta nas seqüências de aminoácidos de proteínas homólogas. Aqui é apresentada a seqüência de aminoácidos de uma proteína humana, junto com as seqüências das proteínas correspondentes de duas espécies de leveduras, *S. pombe* e *S. cerevisiae*. (A, cortesia de I. Rebay; B, cortesia de Walter Gehring; C, de B. Alberts et al., *Essential Cell Biology*, 2nd ed. New York: Garland Science, 2004.)

(Estimava-se, em certo estágio do seqüenciamento do genoma humano, que o Cromossomo 1 humano – o maior do conjunto – continha 3.041 genes diferentes.) Na verdade, o tamanho de um cromossomo, visto sob o microscópio, é aproximadamente proporcional ao número de genes que ele transporta.

Descobriu-se que cada gene se localiza em um sítio específico ao longo da extensão de um cromossomo específico. Esse sítio é freqüentemente denominado **loco** genético. Os geneticistas despenderam muitos esforços durante todo o século vinte para mapear os sítios dos genes – locos genéticos – ao longo dos cromossomos de uma espécie (Figura 1.8).

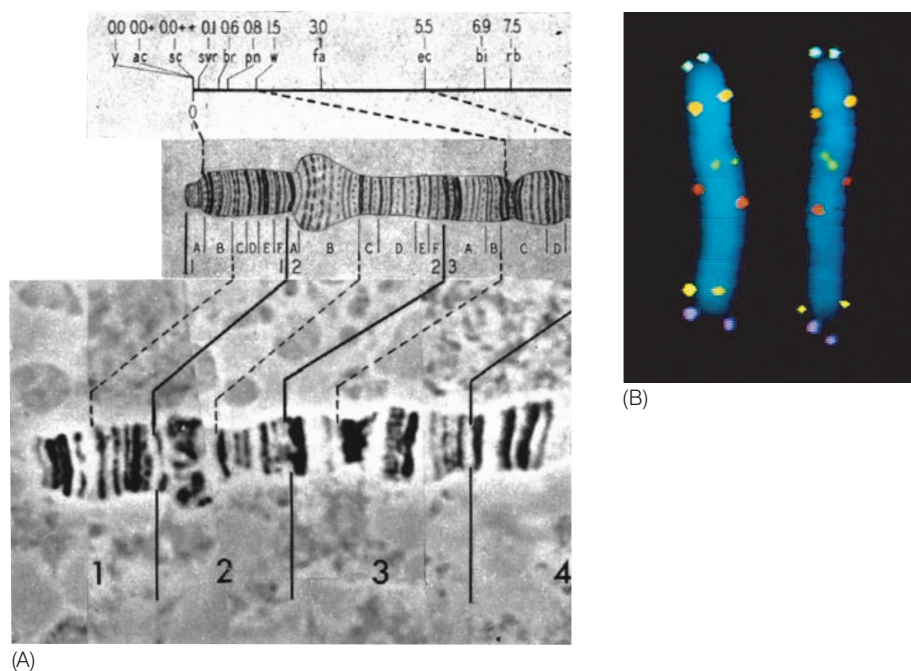
Descobriu-se que o estado genético diplóide que prevalece na maioria das células de todo o corpo era infringido em um importante tipo de células – as *células germinativas*, o espermatozóide e o óvulo. Essas células contêm uma única cópia de cada cromossomo e gene e são, portanto, chamadas de **haplóides**. Durante a formação das células germinativas nos testículos e ovários, cada par de cromossomos é separado, e um dos dois cromossomos (e assim os genes associados) é escolhido ao acaso para ser incorporado no espermatozóide ou óvulo. Quando o espermatozóide e o óvulo subsequentemente se combinam durante o processo de fertilização, os dois genomas haplóides se fundem para produzir o novo genoma diplóide do óvulo fertilizado. Todas as células do organismo descendem diretamente de uma célula diplóide e, se tudo der certo, herdam réplicas precisas de seu genoma diplóide. Em um organismo multicelular grande como o ser humano, isso significa que uma cópia completa do genoma está presente em quase todas as cerca de 3×10^3 células de todo o corpo!

A partir da compreensão de que os genes se situam nos cromossomos, e que um conjunto completo de cromossomos está presente em quase todos os tipos de células do corpo, veio ainda outra conclusão que fora raramente observada: os genes agem de forma a criar os fenótipos de um organismo por meio de sua capacidade de agir localmente, ao influenciar o comportamento de suas células individuais. A alternativa – de que um único conjunto de genes, situado em um sítio anatômico único no organismo, controla o desenvolvimento e a fisiologia de todo o organismo – é hoje desacreditada.

Descobriu-se que a regra de cromossomos pareados e similares era infringida por alguns cromossomos sexuais. Nas células das fêmeas dos mamíferos placentários (em que o desenvolvimento do embrião é mantido primariamente pela placenta), existem dois cromossomos X similares, os quais se comportam como os demais cromossomos das células das fêmeas – os cromossomos não-sexuais, freqüentemente chamados de **autossomos**. Porém, nos machos, um cromossomo X forma par com um cromossomo Y, o qual é menor e transporta um conjunto muito menor de genes. Em humanos, acredita-se que o cromossomo X carrega cerca de 900 genes, em comparação com os 78 diferentes genes no cromossomo Y, os quais, devido à redundância, especificam somente 27 proteínas diferentes (Figura 1.9).

Essa assimetria na configuração dos cromossomos sexuais coloca os machos em desvantagem biológica. Muitos dos cerca de 900 genes no cromossomo X são vitais ao desenvolvimento e à função normal do organismo. A dupla redundância criada pelos cromossomos X pareados

Figura 1.8 Localização dos genes ao longo dos cromossomos (A) A estrutura física dos cromossomos de *Drosophila* pôde ser mapeada tirando proveito dos cromossomos das glândulas salivares da mosca, que exibem padrões de bandas resultantes da alternância de regiões cromossômicas claras (esparças) e escuras (condensadas) (*abaixo*). Independentemente, cruzamentos genéticos indicaram as localizações cromossômicas relativas de centenas de diferentes locos genéticos ao longo de mapas genéticos lineares (*acima*). As localizações desses locos foram depois alinhadas com mapas físicos de bandas, como o aqui mostrado para o início do braço esquerdo do Cromossomo 1 de *Drosophila*. (B) A disponibilidade de sondas de DNA que hibridizam especificamente a vários genes torna hoje possível a localização de genes ao longo de um cromossomo pela marcação de cada sonda com um corante fluorescente específico ou uma combinação de corantes. Aqui, usando a técnica de hibridização *in situ* por fluorescência (FISH), em cromossomos em metáfase, seis diferentes genes foram localizados em vários sítios ao longo do Cromossomo 5 humano. (Há dois pontos para cada gene porque os cromossomos estão presentes em forma duplicada durante a metáfase na mitose.) (A, cortesia de M. Singer e P. Berg, *Genes and Genomes*, Mill Valley, CA: University Science Books, 1991, como tirado de C. B. Bridges, *J. Heredity* 26:60, 1935; B, cortesia de David C. Ward.)



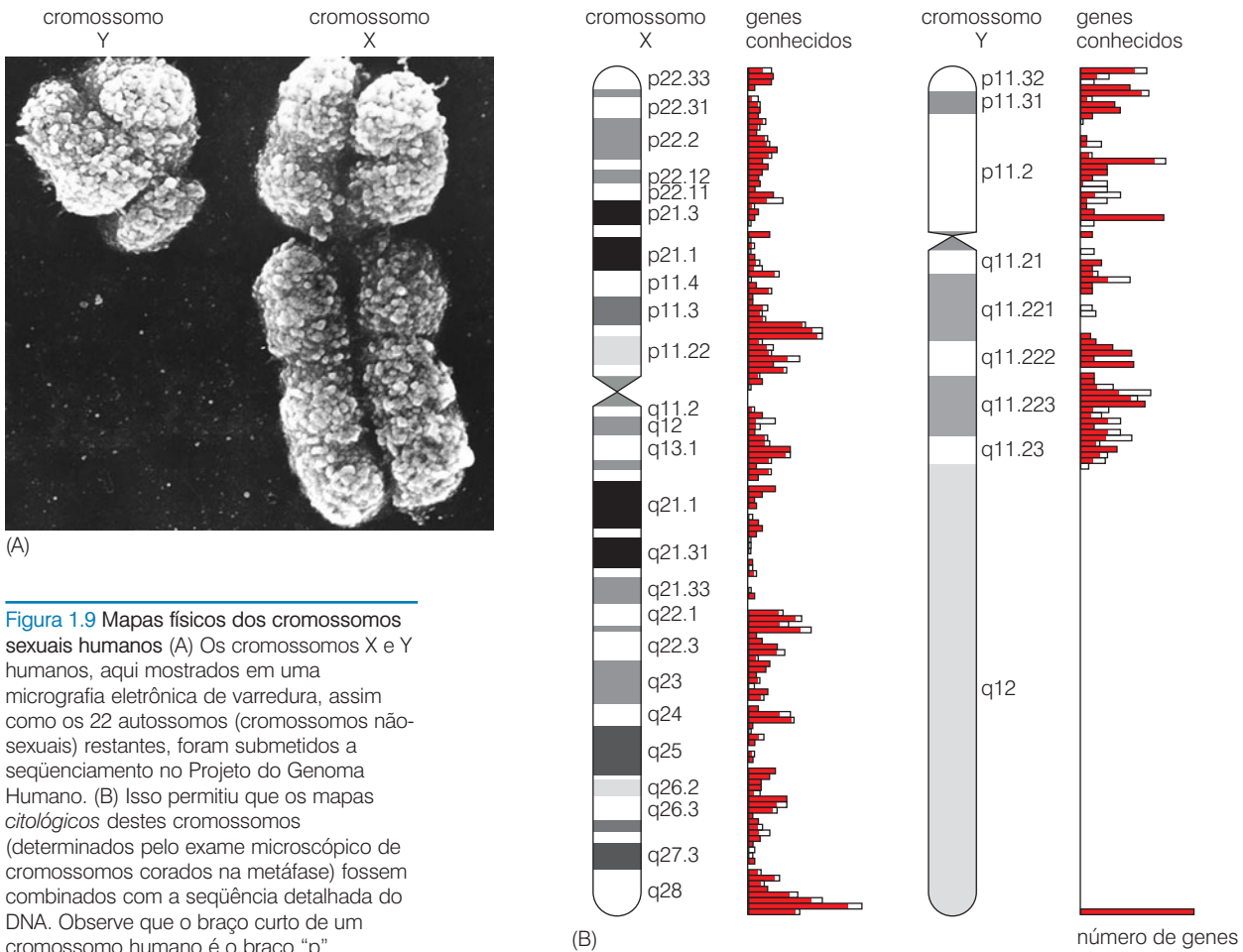


Figura 1.9 Mapas físicos dos cromossomos sexuais humanos (A) Os cromossomos X e Y humanos, aqui mostrados em uma micrografia eletrônica de varredura, assim como os 22 autossomos (cromossomos não-sexuais) restantes, foram submetidos a seqüenciamento no Projeto do Genoma Humano. (B) Isso permitiu que os mapas citológicos destes cromossomos (determinados pelo exame microscópico de cromossomos corados na metáfase) fossem combinados com a seqüência detalhada do DNA. Observe que o braço curto de um cromossomo humano é o braço “p”, enquanto o braço longo é o braço “q”. Cada cromossomo foi dividido em regiões com base no padrão de bandas observado, e diferentes genes foram atribuídos a cada região cromossômica com base nas análises de seqüências (*histogramas à direita de cada cromossomo*). Genes identificados são barras cheias (*vermelho*), enquanto seqüências que parecem codificar genes ainda a ser identificados são barras abertas. O cromossomo Y humano tem ~57 megabases (Mb) de extensão, ao passo que o cromossomo X tem ~155 Mb. (A, cortesia de Indigo® Instruments; B, cortesia de The Wellcome Trust Sanger Institute.)

assegura uma biologia mais robusta. Se a cópia de um gene em um dos cromossomos X é defeituosa (i.e., um alelo mutante não-funcional), existem chances de que a segunda cópia do gene no outro cromossomo X continue a realizar a tarefa do gene, assegurando uma função biológica normal. Os machos não possuem esse sistema genético a prova de falhas em seus cromossomos sexuais. Uma das consequências mais benignas desse fato é o daltonismo, que afeta machos frequentemente e fêmeas com pouca frequência, devido à localização, no cromossomo X, dos genes que codificam as proteínas que detectam as cores na retina. Contudo, essa disparidade entre os gêneros é abrandada em certa extensão pela natureza (Barra lateral 1.2).

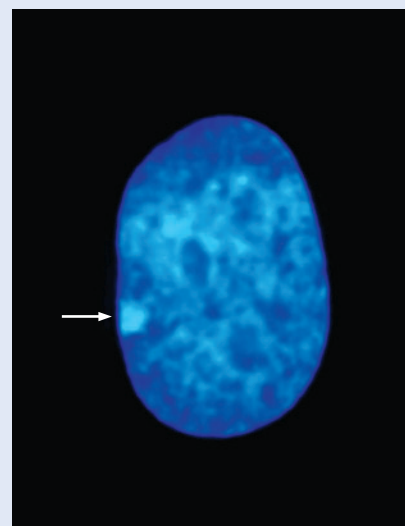
O daltonismo revela a vantagem de ter duas cópias gênicas redundantes a fim de assegurar que a função biológica seja mantida. Se uma cópia for perdida devido à inativação por mutação, a cópia gênica sobrevivente é muitas vezes capaz de especificar um fenótipo tipo selvagem. Tal redundância funcional opera na grande maioria dos genes carregados pelos autossomos. Como veremos posteriormente, essa dinâmica executa um importante papel no desenvolvimento do câncer, uma vez que virtualmente todos os genes que operam na prevenção da proliferação fora de controle das células estão presentes em duas cópias redundantes em nossas células, as quais devem ser perdidas para que suas funções supressoras de crescimento sejam perdidas e ocorra a proliferação de células malignas.

1.4 Os cromossomos estão alterados na maioria dos tipos de células cancerosas

Os genes individuais são pequenos demais para serem vistos em um microscópio óptico, e mutações sutis em um gene são ainda menores. Consequentemente, a maioria das mutações

Barra lateral 1.2 As células femininas podem obter informações apenas de cromossomos X únicos Na representação mais simples do comportamento dos cromossomos sexuais, cada célula masculina depende da informação transportada por seu cromossomo X único, enquanto cada célula feminina é capaz de consultar seus dois cromossomos X. Devido ao grande número de genes existente no cromossomo X, essa disparidade criaria diferenças fisiológicas substanciais entre células masculinas e femininas, visto que as fêmeas expressariam geralmente em dobro cada um dos produtos especificados pelos genes em seus cromossomos X. Esse problema é resolvido pelo mecanismo de inativação do X. Cedo na embriogênese, um dos dois cromossomos X é inativado ao acaso em cada uma das células de um embrião feminino. Essa inativação ocasiona o silenciamento funcional de quase todos os genes nesse cromossomo e a condensação desse cromossomo em uma pequena partícula denominada **corpúsculo de Barr** (Figura 1.10). Subsequentemente, todos os descendentes de uma célula que escolheu inativar um cromossomo X específico herdarão tal padrão de inativação cromossômica e continuarão, portanto, a carregar o mesmo cromossomo X inativado. Dessa maneira, a vantagem feminina de carregar cópias redundantes de genes associados ao cromossomo X é apenas parcial.

Figura 1.10 Cromossomos X como corpúsculos de Barr Um dos dois cromossomos X em cada célula é inativado ao acaso nas células de embriões femininos precoces, e permanece inativado em todos os descendentes lineares. Ele é visível nos núcleos interfásicos, nos quais permanece condensado e associado à membrana nuclear (*seta branca*). (De B. P. Chadwick et al., *Semin. Cell Dev. Biol.* 14:359-367, 2003.)



que desempenha um papel no câncer não pode ser visualizada por meio de um microscópio. Contudo, o exame dos cromossomos pelo microscópio óptico pode fornecer evidências de alterações em grande escala no genoma da célula. Na verdade, tais alterações foram observadas já em 1914, especialmente nas células cancerosas.

Hoje sabemos que as células cancerosas freqüentemente apresentam cromossomos com estruturas aberrantes de vários tipos, perda de cromossomos inteiros, presença de cópias extra de outros cromossomos e fusão do braço de um cromossomo com parte de outro. Essas mudanças na configuração cromossômica em geral ampliam nossa concepção de como as mutações podem afetar o genoma: uma vez que alterações na estrutura cromossômica geral e no número também constituem tipos de mudanças genéticas, tais mudanças devem ser consideradas conseqüências das mutações (veja a Barra lateral 1.3). E, o mais importante, os cromossomos aberrantes inicialmente vistos nas células cancerosas forneceram o primeiro indício de que essas células poderiam ser geneticamente aberrantes, ou seja, de que eram mutantes.

A configuração normal dos cromossomos é geralmente denominada estado cariotípico **euplóide**. A euploidia implica que cada um dos autossomos está presente em pares normalmente estruturados, e que os cromossomos X e Y estão presentes em número apropriado para o sexo do indivíduo que os carrega. Como mencionado anteriormente, a divergência do cariótipo euplóide – estado denominado **aneuploidia** – é observada em muitas células cancerosas. Com freqüência, essa aneuploidia é uma mera conseqüência do caos geral que prevalece em uma célula cancerosa. Porém, essa conexão entre aneuploidia e proliferação de células malignas também faz alusão a um tema ao qual retornaremos repetidamente neste livro: a aquisição de cópias extra de um cromossomo ou a perda de outro pode criar uma configuração genética que de alguma maneira beneficia a célula cancerosa e seu programa de proliferação fora de controle.

1.5 As mutações que causam câncer ocorrem tanto na linhagem germinativa como na somática

Como as mutações alteram o conteúdo da informação dos genes, os alelos mutantes de um gene podem ser passados do progenitor à descendência. Diz-se que essa transmissão de uma

Barra lateral 1.3 As células cancerosas são geralmente aneuplóides. A presença de cromossomos com estruturas anormais e mudanças no número cromossômico forneceram o primeiro indício, no início do século XX, de que mudanças no genótipo celular geralmente acom-

panham e talvez causem a proliferação descontrolada de células malignas. Essas divergências do cariótipo euplóide normal podem ser classificadas em uma série de categorias. Cromossomos que parecem ser estruturalmente normais podem se acumular em cópias extra, che-

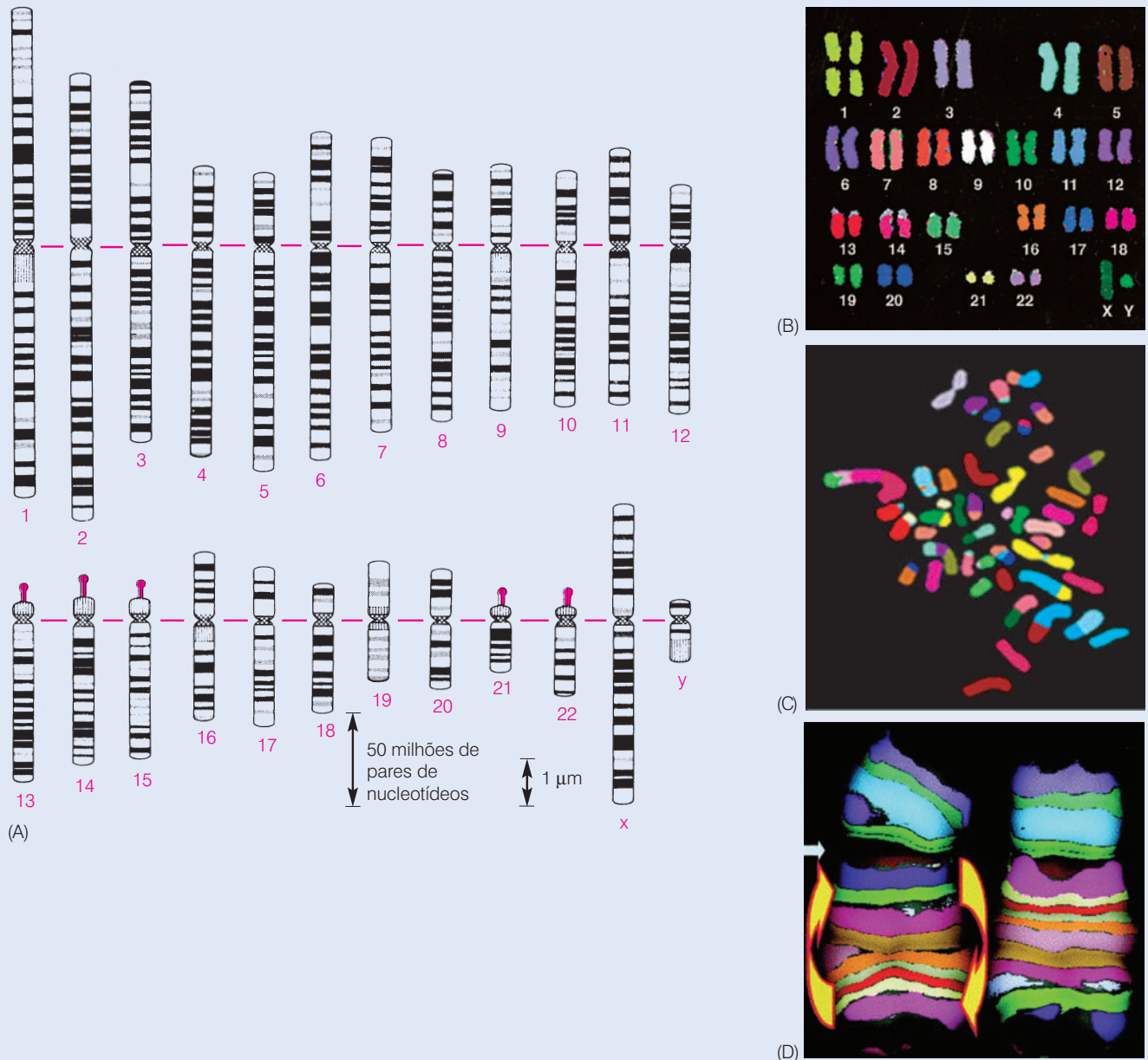


Figura 1.11 Complementos cromossômicos normais e anormais. (A) A coloração de cromossomos em metáfase revela um padrão característico de bandas claras e escuras para cada cromossomo. O arranjo completo dos cromossomos humanos é aqui indicado esquematicamente. (B) As técnicas de análise espectral do cariótipo (SKY) e hibridização *in situ* por fluorescência da banda M (mFISH) permitem a um especialista “pintar” individualmente cada cromossomo humano em metáfase com uma cor diferente (pela hibridização de sondas de DNA cromossomo-específicas marcadas com vários corantes fluorescentes para os cromossomos). As cores reais, de imagens como essas, são geradas por computador. É apresentado o cariótipo diplóide de uma célula humana normal. (C) Cariótipo aneuplóide de uma célula

de câncer de mama humano, em que alguns cromossomos estão presentes em número inadequado e em que translocações (trocas de segmentos entre cromossomos) são visíveis. (D) Aqui, usou-se a técnica de mFISH para marcar sub-regiões intracromossômicas com corantes fluorescentes específicos, mostrando que uma grande porção de um braço do Cromossomo 5 humano normal (*direita*) foi invertida (*esquerda*); estas são de uma célula de um operário que havia sido exposto a plutônio na indústria de armas nucleares da antiga União Soviética. (A, adaptada de U. Francke, *Cytogenet. Cell Genet.* 31:24-32, 1981; B, de E. Schröck et al., *Science* 273:494-497, 1996. © AAAS; C, cortesia de J. M. Davidson e P. A. W. Edwards; D, de M. P. Hande et al., *Am. J. Hum. Genet.* 72:1162-1170, 2003.)

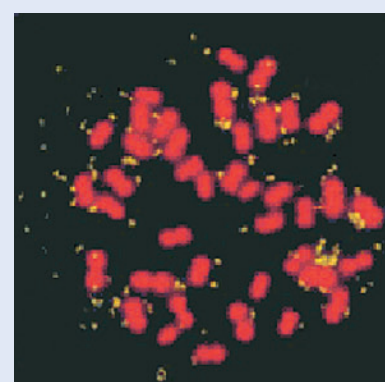
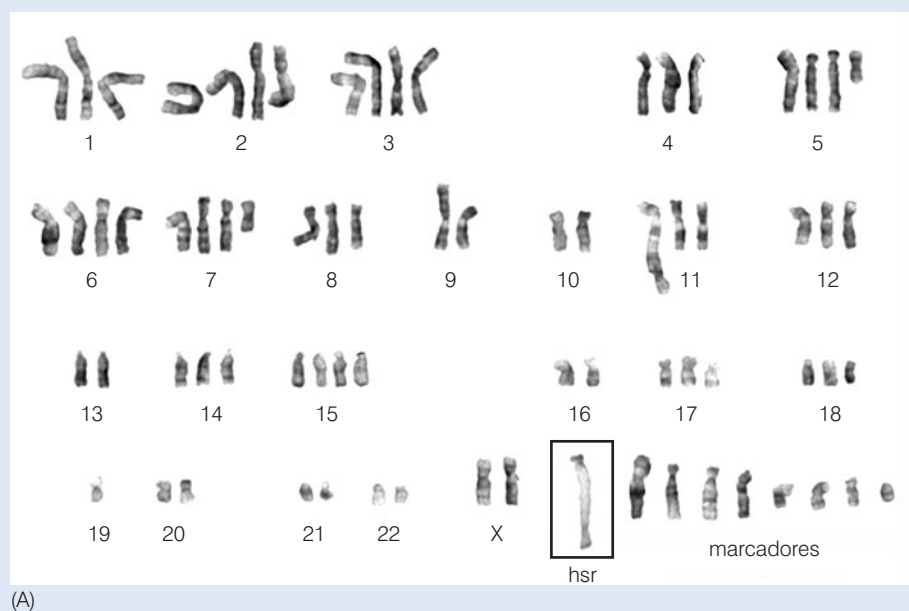
gando a três, quatro ou mesmo mais cópias de cada cromossomo por núcleo de célula cancerosa (Figura 1.11); tais divergências do número cromossômico normal são manifestações de aneuploidia.

Alternativamente, os cromossomos podem sofrer mudanças em sua estrutura. Um segmento pode ser separado de um braço cromossômico e se fundir ao braço de outro cromossomo, resultando em uma **translocação** cromossômica (Figura 1.11C). Alternativamente, segmentos cromossômicos podem ser trocados entre cromossomos de diferentes pares de cromossomos, resultando em **translocações recíprocas**. Um segmento cromossômico pode também se inverter, o que pode afetar a regulação de genes localizados perto de pontos de quebra-e-fusão (Figura 1.11D).

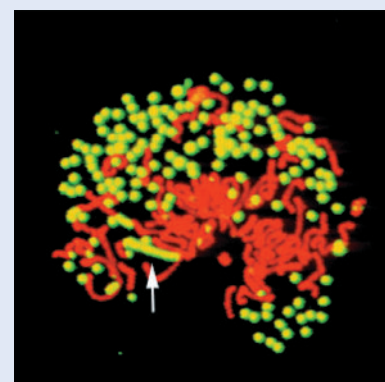
Um segmento de um cromossomo pode ser copiado muitas e muitas vezes, e as cópias extra resultantes podem se fundir no sentido cabeça-cauda em longos arranjos dentro de um segmento cromossômico, o qual é denominado HSR (**região homogeneamente corada**; Figura

1.12A). Um segmento também pode ser clivado de um cromossomo, se replicar como uma entidade extracromossômica autônoma e aumentar seu número de cópias por núcleo, resultando no aparecimento de fragmentos subcromossômicos denominados DMs (**minutos duplos**; Figura 1.12B). Essas duas últimas alterações provocam o aumento do número de cópias de genes existentes em tais segmentos, resultando em **amplificação gênica**. Às vezes, ambos os tipos de amplificação coexistem na mesma célula (Figura 1.12C). As amplificações gênicas podem favorecer a multiplicação das células cancerosas pelo aumento do número de cópias de genes promotores de crescimento.

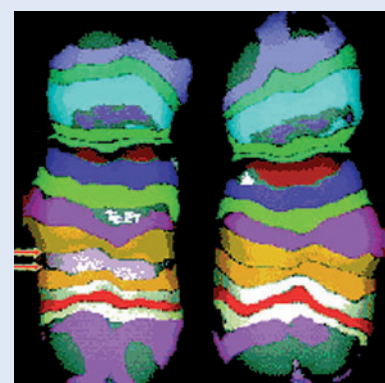
Em alguns casos, certos genes inibidores de crescimento podem ser descartados pelas células cancerosas durante seu desenvolvimento. Por exemplo, quando um segmento no meio de um braço cromossômico é descartado e as regiões cromossômicas flangeadoras se unem, isso resulta em uma **deleção intersticial** (Figura 1.12D).



(B)



(C)



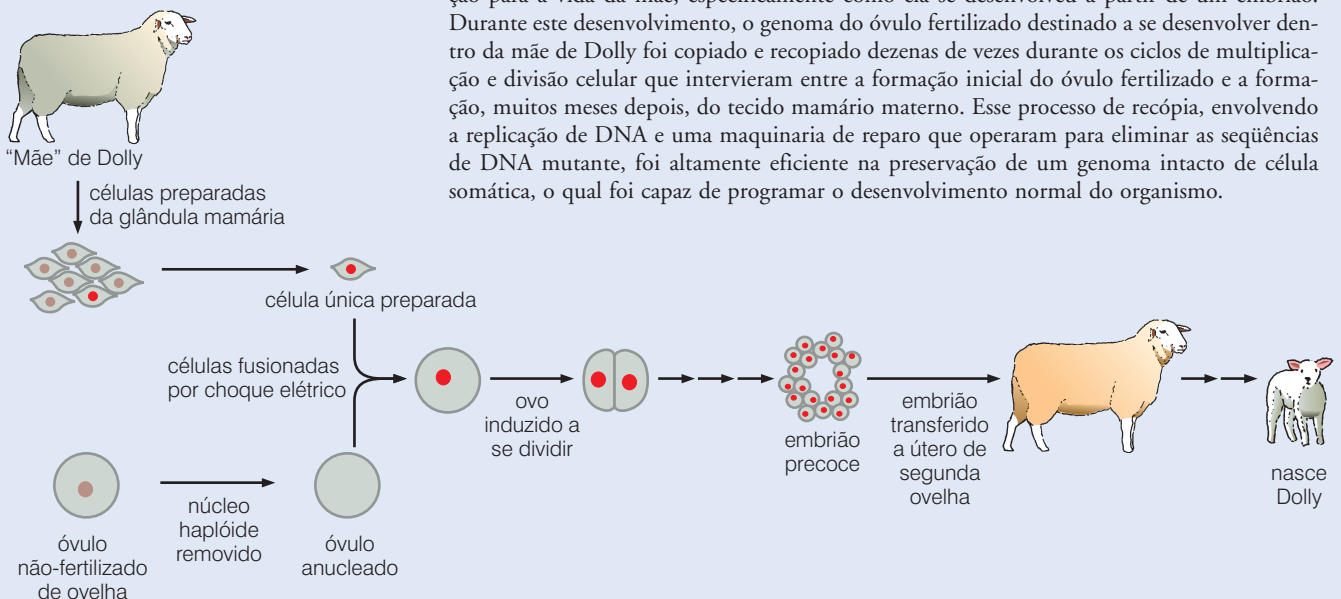
(D)

Figura 1.12 Aumentos e decréscimos no número de cópias de segmentos cromossômicos (A) A coloração de Giemsa pode revelar mudanças no padrão normal de bandas das regiões cromossômicas. Uma região homogeneamente corada (HSR) ocorre devido a repetidos ciclos de reduplicação de um segmento cromossômico, produzindo muitas cópias enfileiradas desse segmento e a concomitante amplificação (aumento) do número de cópias de seus genes. Vê-se, aqui, uma HSR observada em uma linhagem celular de carcinoma hepatocelular. (B) Cromossomos minutos duplos (DMs) derivam de segmentos cromossômicos que se quebraram de seus sítios originais e sofreram repetidas replicações como elementos extracromossômicos; assim como as cromátides de cromossomos normais, essas estruturas são duplicadas durante a metáfase da mitose. São mostradas células de câncer de mama de camundongo que apresentam cópias amplificadas do oncogene *HER2/Neu* localizadas em DMs (*manchas amarelas*) que não estão associadas aos cromossomos (*vermelho*) nessas células. Os DMs foram detectados usando a técnica de FISH com uma sonda reativa contra esse oncogene. (C) Ocasionalmente, pode-se encontrar um gene amplificado tanto em uma região homogeneamente corada (dentro de um cromossomo) como em minutos duplos. Aqui, a análise de células COLO320, uma linhagem de células de tumores neuroendócrinos humanos, revela múltiplas cópias do oncogene *myc* (*amarelo*), que estudaremos no Capítulo 8, em meio aos cromossomos (*vermelho*). A seta indica uma HSR, enquanto muitas dúzias de DMs são evidentes. (D) O uso da técnica de mFISH revelou que um segmento dentro do Cromossomo 5 humano normal (*direita*) foi deletado (uma deleção intersticial) após frequente exposição à radiação vinda de plutônio (*setas emparelhadas, esquerda*). (A, de J.-M. Wen et al., *Cancer Genet. Cytogenet.* 135:91-95, 2002; B, de C. Montagna et al., *Oncogene* 21:890-898, 2002; C, de N. Shimizu et al., *J. Cell Biol.* 140:1307-1320, 1998; D, de M. P. Hande et al., *Am. J. Hum. Genet.* 72:1162-1170, 2003.)

geração à seguinte, possível graças às células germinativas (espermatozóide e óvulo), ocorre via **linhagem germinativa**. Significativamente, a transmissão, via linhagem germinativa, de um alelo mutante recentemente criado em um organismo à sua descendência pode ocorrer somente se uma pré-condição for obedecida: a mutação correspondente deve afetar um gene carregado no genoma de um espermatozóide ou óvulo ou no genoma de um dos tipos celulares que são precursores imediatos do espermatozóide ou óvulo dentro das gônadas. As mutações que afetam os genomas de células em todas as outras partes do corpo – que constituem o **soma** – podem muito bem afetar as células específicas nas quais tais mutações ocorrem, mas não terão qualquer chance de transmissão à descendência do organismo. Tais **mutações somáticas** não podem ser incorporadas aos veículos da transmissão genética de geração a geração – os cromossomos de espermatozoides e óvulos.

As mutações somáticas são de importância vital para o processo de formação do câncer. Como descrito repetidamente ao longo deste livro, uma mutação somática pode afetar o comportamento da célula em que ocorre e pode, por meio de repetidos ciclos de multiplicação e divisão celular, ser passada a todas as células descendentes dentro de um tecido. Diz-se que esses descendentes diretos de uma única célula progenitora, os quais podem em última análise ser em número de milhões ou mesmo bilhões, constituem um **clone** de células, em que a ancestralidade de todos os membros deste grupo de células remonta diretamente à célula única em que a mutação originalmente ocorreu.

Figura 1.13 Clonagem e integridade genômica No procedimento de clonagem reprodutiva, remove-se o núcleo de um óvulo não-fertilizado e, em seu lugar, é introduzido o núcleo de uma célula somática. Após, a célula diplóide resultante, formalmente equivalente a um óvulo fertilizado, é induzida à divisão, gerando um embrião que pode então ser implantado no útero de uma mãe adotiva e pode se desenvolver em um recém-nascido. A geração bem-sucedida de um recém-nascido saudável demonstra que a célula somática doadora carregava o genoma da espécie em forma funcional e essencialmente intacta.



Barra lateral 1.4 A clonagem reprodutiva demonstra a extraordinária eficiência da maquinaria de reparo A eficiência da complexa maquinaria que repara o DNA (veja o Capítulo 12), a resultante supressão de mutações somáticas e a conseqüente integridade dos genomas das células somáticas foram demonstradas, de forma dramática, pelo sucesso da clonagem animal nos últimos anos. No caso bastante celebrado da ovelha Dolly, foram retiradas células do tecido mamário de sua "mãe", removeram-se os núcleos dessas células, e esses núcleos foram, então, implantados em células-ovo (ovócitos) cujos núcleos haviam sido previamente eliminados. As células resultantes, que continham núcleos do doador e citoplasma do óvulo do receptor, foram então induzidas à proliferação, para a formação de embriões (Figura 1.13). O fato de que uma ovelha (Dolly) essencialmente normal nasceu muitos meses depois, tendo se desenvolvido a partir de um desses embriões, demonstrou que o genoma de uma das células da glândula mamária de sua mãe não carregava mutações que comprometessem o desenvolvimento embrionário normal.

A integridade implícita no genoma das células mamárias da mãe de Dolly chama a atenção para a vida da mãe, especificamente como ela se desenvolveu a partir de um embrião. Durante este desenvolvimento, o genoma do óvulo fertilizado destinado a se desenvolver dentro da mãe de Dolly foi copiado e recopiado dezenas de vezes durante os ciclos de multiplicação e divisão celular que intervieram entre a formação inicial do óvulo fertilizado e a formação, muitos meses depois, do tecido mamário materno. Esse processo de recópia, envolvendo a replicação de DNA e uma maquinaria de reparo que operaram para eliminar as seqüências de DNA mutante, foi altamente eficiente na preservação de um genoma intacto de célula somática, o qual foi capaz de programar o desenvolvimento normal do organismo.

Uma elaborada maquinaria de reparo celular dentro de cada célula continuamente monitora o genoma da célula e, com grande eficiência, remove e elimina seqüências mutantes, substituindo-as por seqüências tipo selvagens adequadas (veja a Barra lateral 1.4; no Capítulo 12, examinaremos essa maquinaria de reparo em profundidade). Essa maquinaria mantém a integridade genômica ao minimizar o número de mutações que atacam o genoma e são assim perpetuadas pela transmissão às células descendentes. Contudo, nenhum sistema de detecção de danos e reparo é infalível. Alguns erros na seqüência genética escapam a seu exame minucioso, acabam se fixando no genoma da célula, são copiados em novas moléculas de DNA e são, dessa forma, transmitidos como mutações às células da progênie. Nesse sentido, muitas mutações que se acumulam no genoma representam conseqüências de omissões ocasionais feitas pela maquinaria de reparo. Todavia, outras são o resultado de danos catastróficos ao genoma, excedendo a capacidade da maquinaria de reparo.

1.6 O genótipo incorporado nas seqüências de DNA cria o fenótipo por meio das proteínas

Os genes estudados na genética mendeliana são essencialmente abstrações matemáticas. A genética mendeliana explica sua transmissão, mas não esclarece como os genes criam os fenótipos celulares e do organismo. As características fenotípicas podem variar de traços comportamentais complexos e geneticamente moldados, à *morfologia* (aspecto, forma) de células e organelas subcelulares e à bioquímica do metabolismo celular. Essa incógnita de como o genótipo cria o fenótipo representou o principal problema da biologia do século XX. Na verdade, tentativas de estabelecer uma conexão entre os dois se transformaram na obsessão de muitos biólogos moleculares durante a segunda metade do século XX e assim continuam no século XXI, pois ainda possuímos um entendimento incompleto de como o genótipo influencia o fenótipo.

A biologia molecular forneceu o arcabouço conceitual básico para o entendimento dessa conexão. Em 1944, provou-se que o DNA era a entidade química na qual a informação genética das células é transportada. Nove anos depois, Watson e Crick elucidaram a estrutura em dupla hélice do DNA. Doze anos após isso, em 1965, ficou claro que as seqüências nas bases da dupla hélice do DNA determinam exatamente a seqüência de aminoácidos nas proteínas. A estrutura única e a função de cada tipo de proteína na célula são determinadas por sua seqüência de aminoácidos. Portanto, a especificação da seqüência de aminoácidos, que é realizada pelas seqüências de bases no DNA, provê quase toda a informação necessária à construção de uma proteína.

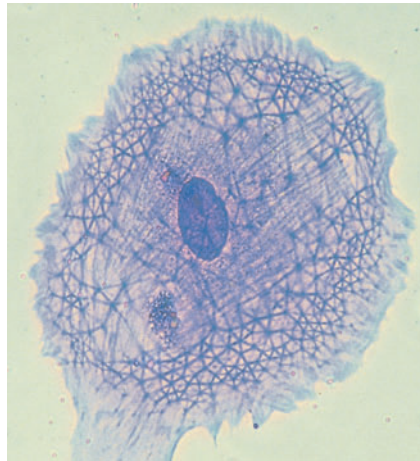
Uma vez sintetizadas nas células, as proteínas continuam a criar o fenótipo, e o fazem de várias formas. Elas podem se agrupar dentro da célula e criar estruturas complexas, as quais são, com freqüência, denominadas componentes da **citoarquitetura** celular ou, mais especificamente, do **citoesqueleto** (Figura 1.14A, B). Quando secretada no espaço entre as células, a estrutura complexa é freqüentemente denominada **matriz extracelular** (ECM); ela liga as células, permitindo-lhes formar tecidos complexos (Figura 1.14C, D). Como veremos posteriormente, a estrutura da ECM é muitas vezes perturbada pelas células cancerosas malignas, permitindo-lhes migrar para locais dentro de um tecido e do organismo que são normalmente proibidos a elas.

Muitas proteínas funcionam como enzimas que catalisam as milhares de reações bioquímicas que, juntas, são denominadas **metabolismo intermediário**; sem a intervenção ativa das enzimas, poucas dessas reações ocorreriam espontaneamente. As proteínas também são capazes de se contrair e criar movimentos celulares (**mobilidade**; Figura 1.15), bem como contração muscular. A mobilidade celular também parece exercer um papel no desenvolvimento do câncer, ao permitir que as células cancerosas se espalhem pelos tecidos e migrem para órgãos distantes.

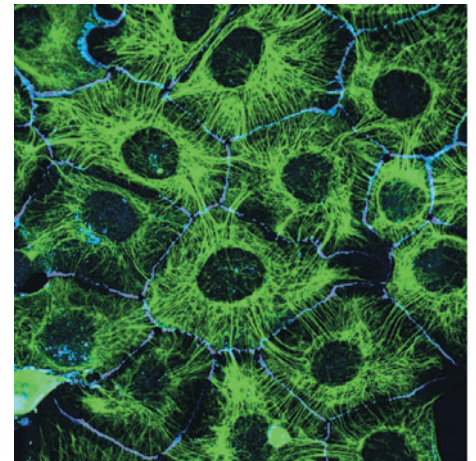
E, o mais importante para o processo de formação do câncer, as proteínas podem levar sinais entre as células, de modo a possibilitar que tecidos complexos mantenham os números adequados dos tipos celulares constituintes. No interior de células individuais, certas proteínas

Figura 1.14 Estrutura intracelular e

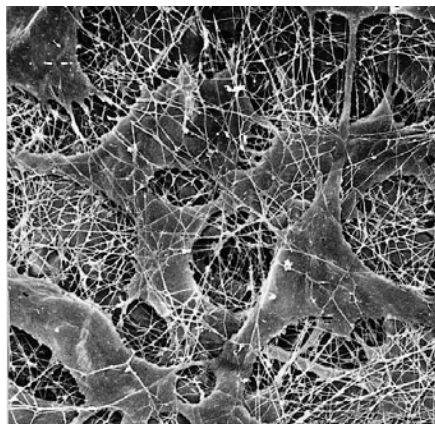
extracelular (A) O citoesqueleto é montado a partir de complexas redes de filamentos intermediários, actina e microtúbulos. Juntos, eles geram o formato da célula e possibilitam seu movimento. (B) Aqui, um importante filamento intermediário das células epiteliais – queratina – é detectado usando um anticorpo antikeratina-específico (verde). Os limites das células são marcados com um segundo anticorpo, que reage com uma proteína de membrana plasmática (azul). (C) As células secretam um conjunto diverso de proteínas, as quais se agrupam na matriz extracelular (ECM). Uma micrografia eletrônica de varredura revela a complexa malha de fibras de colágeno, glicoproteínas, hialuronano e proteoglicanos, em que estão incrustados os fibroblastos (células do tecido conjuntivo). (D) Célula da linhagem celular NIH 3T3, extensivamente usada na biologia de células cancerosas, em meio a uma rede de fibras de fibronectina (verde) da ECM. Os pontos de ligação celular à fibronectina são mediados por receptores de integrina na superfície celular (laranja, amarelo). (A, cortesia de Colin Smith; B, cortesia de Kathleen Green e Evangeline Amargo; C, de T. Nishida et al., *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 29:1887-1890, 1988. © Association for Research in Vision and Ophthalmology; D, de E. Cukierman et al., *Curr. Opin. Cell Biol.* 14:633-639, 2002.)



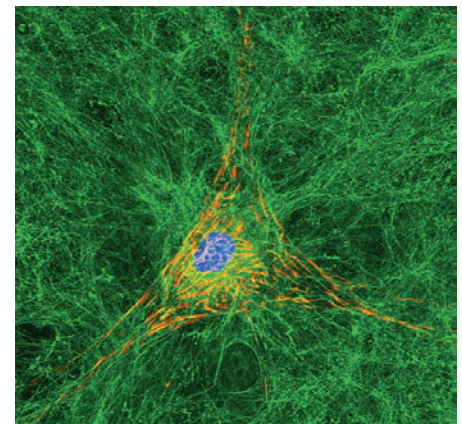
(A)



(B)



(C)



(D)

recebem sinais de uma fonte, processam esses sinais e passam-nos para outra proteína dentro da célula; tais funções de processamento de sinal, freqüentemente denominadas **transdução** de sinal intracelular, também são essenciais à criação dos cânceres, uma vez que muitos fenótipos de multiplicação anormal das células cancerosas resultam do funcionamento aberrante de moléculas transdutoras de sinal intracelular.

A versatilidade funcional das proteínas torna evidente que quase todos os aspectos do fenótipo da célula e do organismo podem ser criados pelas ações das proteínas. Uma vez percebido isso, podemos descrever o genótipo e o fenótipo em termos moleculares mais simples: o genótipo reside nas seqüências de bases no DNA, enquanto o fenótipo deriva das ações das proteínas. (Na verdade, essa descrição é simplista, pois ignora o importante papel das moléculas de RNA como intermediários entre as seqüências de DNA e a estrutura de proteínas, e as capacidades recentemente descobertas de certas moléculas de RNA de funcionar como enzimas e como reguladores da expressão de certos genes.)

Nas complexas células eucarióticas dos animais, tal como nas células **procarióticas** mais simples das bactérias, as seqüências de DNA são copiadas em moléculas de RNA no processo denominado **transcrição**; diz-se que um gene que está sendo transcrito é ativamente **expresso**, ao passo que um gene que não está sendo transcrito é freqüentemente considerado **reprimido**. Na versão mais simples da transcrição, a transcrição de um gene produz uma molécula de RNA de extensão comparável ao próprio gene. Uma vez sintetizadas, as seqüências de bases na molécula de RNA são **traduzidas** pelas fábricas que sintetizam proteínas na célula, os **ribossomos**, em uma seqüência de aminoácidos. A macromolécula resultante, que pode ter centenas ou mesmo milhares de aminoácidos de extensão, dobra-se em uma configuração tridimensional única e torna-se uma proteína funcional (Figura 1.16).

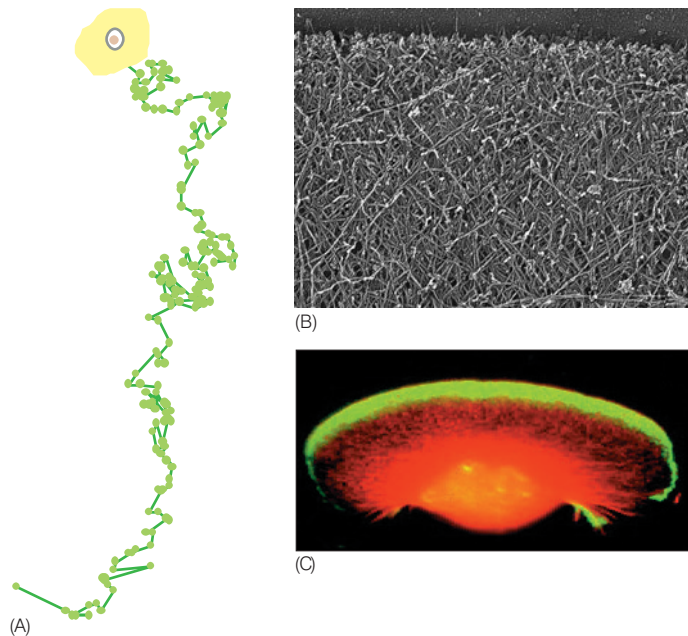


Figura 1.15 Motilidade da célula (A) O movimento de células individuais pode ser observado em uma placa de cultura, em que suas localizações são traçadas em intervalos e eletronicamente marcadas. Essa imagem traça o movimento de uma célula endotelial vascular humana (o tipo celular que forma o revestimento dos vasos sanguíneos) em direção a dois compostos atrativos localizados na parte de baixo – fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e esfingosina-1-fosfato (S1P). Supõe-se que tal locomoção seja crítica à formação de novos vasos sanguíneos dentro de um tumor. Cada ponto representa uma posição registrada em intervalos de 10 min. Essa motilidade é possível graças a complexas redes de proteínas que formam os citoesqueletos das células. (B) Aqui vê-se a rede de filamentos de actina agrupada na extremidade líder de uma célula móvel. (C) A célula avançando é um queratócito de peixe; sua extremidade líder (verde) é empurrada para a frente pela rede de filamentos de actina. (A, cortesia de C. Furman e F. Gertler; B e C, de T. Svitkina e G. Borisy, *J. Cell Biol.* 145:1009-1026, 1999. © The Rockefeller University Press.)

A modificação **pós-traducional** da proteína inicialmente sintetizada pode resultar na ligação covalente de certos grupos químicos a resíduos específicos de aminoácidos na cadeia protéica; entre essas modificações estão, notavelmente, fosfatos, cadeias laterais de açúcares complexos e grupos acetato (veja a Barra lateral 1.5). Uma igualmente importante modificação pós-traducional envolve a clivagem de uma proteína por uma segunda proteína denominada **protease**, que tem a capacidade de cortar cadeias de aminoácidos em certos sítios. Portanto, a forma final e madura de uma cadeia protéica pode conter muito menos resíduos de aminoácidos do que os presentes na proteína inicialmente sintetizada. Em seguida à sua síntese, muitas proteínas são enviadas a locais específicos dentro da célula ou são exportadas da célula via processo de secreção.

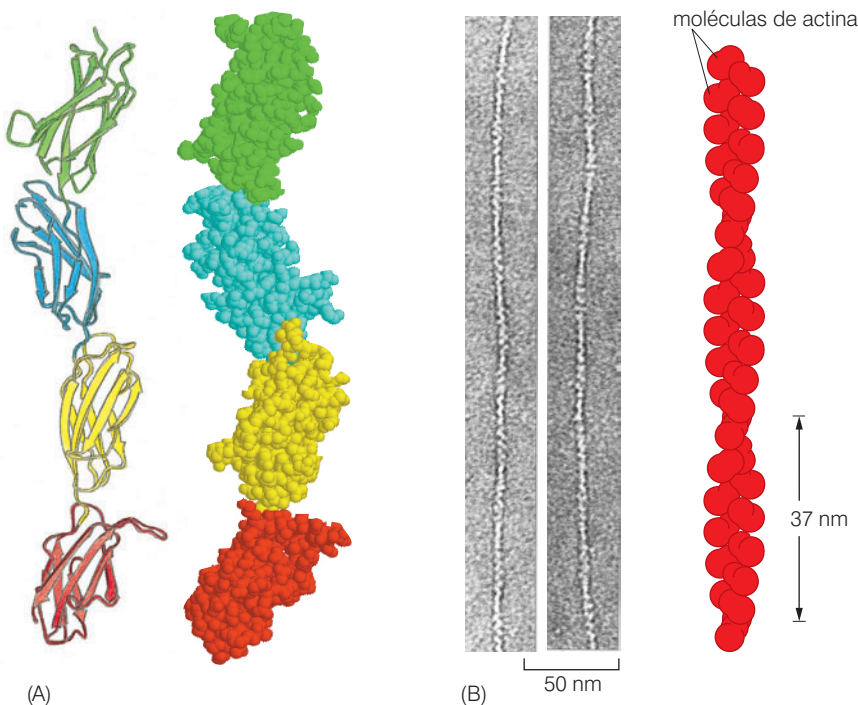
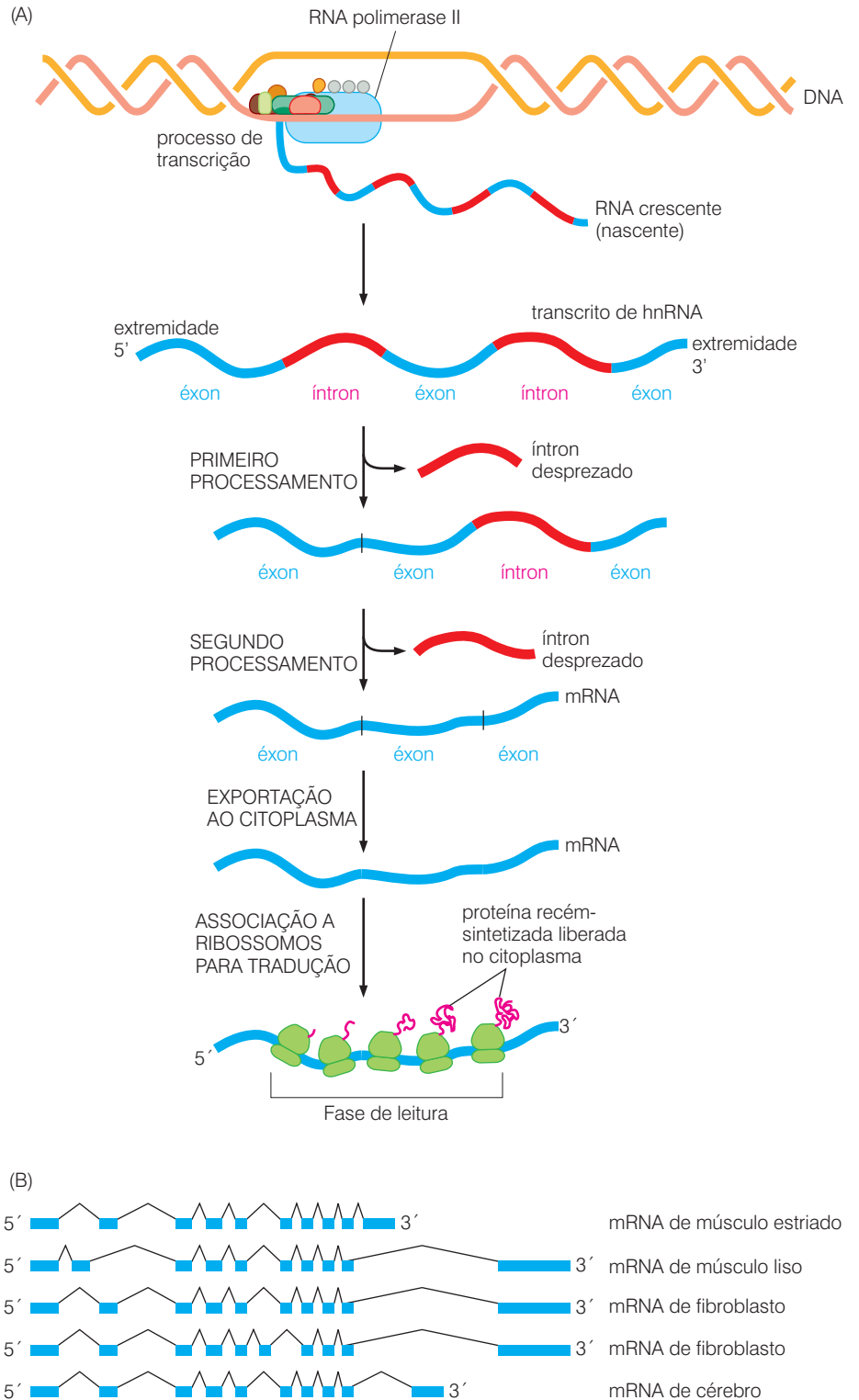


Figura 1.16 Estruturas de proteínas e grupos multiprotéicos (A) A estrutura tridimensional de parte da fibronectina, uma importante proteína de matriz extracelular (veja a Figura 1.14), pode ser representada como um diagrama de fitas (esquerda), que ilustra o caminho tomado pela cadeia de aminoácidos que compõe essa proteína; alternativamente, em um modelo de espaço preenchido (direita), são indicadas as posições dos átomos individuais. Um domínio de fibronectina é composto de quatro diferentes domínios, similarmente estruturados, os quais são mostrados em cores diferentes. (B) As fibras de actina (esquerda), que constituem um importante componente do citoesqueleto (veja as Figuras 1.14 e 1.15), são compostas de grupos de moléculas protéicas individuais, cada qual ilustrado como um diferente corpo de dois lóbulos (direita). (A, adaptado de D. J. Leahy, I. Aukhil e H. P. Erickson, *Cell* 84:155-164, 1996; B, (esquerda) cortesia de Roger Craig, (direita) de B. Alberts et al., *Molecular Biology of the Cell*, 4th ed. New York: Garland Science, 2002.)

Figura 1.17 Processamento de pré-mRNA
 (A) Ao sintetizar uma cópia de RNA complementar a uma das duas fitas de DNA de um gene, a RNA polimerase II cria uma molécula de RNA nuclear heterogêneo (hnRNA) (vermelho e azul). As moléculas de hnRNA que são processadas em mRNAs são denominadas pré-mRNA. A remoção progressiva dos íntrons (vermelho) leva a um mRNA processado contendo apenas éxons (azul). (B) Uma dada molécula de pré-mRNA pode ser processada de várias formas alternativas, gerando diferentes mRNAs, que podem codificar diferentes moléculas protéicas. Estão aqui ilustrados os padrões de *splicing* alternativo tecido-específico da molécula de pré-mRNA da α -tropomiosina, cujos produtos de mRNA especificam importantes componentes da contratilidade (e, portanto, dos músculos) celular. Neste caso, os íntrons são indicados como *sinas de interpolação pretas*, enquanto os éxons são indicados como *retângulos azuis*. (B, adaptado de B. Alberts et al., *Molecular Biology of the Cell*, 4th ed. New York: Garland Science, 2002.)



Nas células eucarióticas – o principal assunto deste livro – a síntese de RNA é um processo complexo por si só. Uma molécula de RNA transcrita a partir de seu gene parental pode inicialmente ser tão extensa quanto o gene. Contudo, logo após sua síntese, segmentos da molécula de RNA, alguns muito pequenos e outros imensos, serão clivados da molécula inicialmente sintetizada. Esses segmentos, denominados **íntrons**, são logo desprezados e, conseqüentemente, não têm impacto sobre a subseqüente capacidade codificante da molécula de

RNA (Figura 1.17). (Na verdade, essa edição das seqüências de uma molécula de RNA pode ocorrer enquanto ela ainda está sendo sintetizada em seu molde de DNA.)

Existem, flanqueando cada íntron, duas seqüências retidas, os **éxons**, os quais são fusionados durante esse evento de *splicing*. A molécula de RNA inicialmente sintetizada e seus derivados encontrados em vários estágios do *splicing*, juntamente com transcritos de RNA nuclear sendo processados de outros genes, constituem, coletivamente, o **hnRNA** (RNA nuclear heterogêneo). O produto final dessas modificações pós-transcricionais pode ser uma molécula de RNA que é somente uma pequena fração da extensão de seu precursor de hnRNA inicialmente sintetizado. É provável que essa molécula final de RNA maduro seja exportada ao citoplasma, no qual, como uma molécula de **mRNA** (RNA mensageiro), serve de molde aos ribossomos que reúnem os aminoácidos que formam as proteínas. (O termo **pré-mRNAs** é muitas vezes usado para designar aqueles hnRNAs que, sabe-se, são precursores de RNAs citoplasmáticos.) Alguns mRNAs maduros podem ter menos de 1% da extensão de seu precursor de pré-mRNA. A complexidade da modificação pós-transcricional do RNA e da modificação pós-traducional das proteínas gera um enorme conjunto de diferentes espécies proteicas dentro da célula (Barra lateral 1.5).

1.7 Os padrões de expressão gênica também controlam o fenótipo

Os cerca de 22.000 genes no genoma mamífero, atuando de forma combinatória nas células individuais, podem criar os extraordinariamente complexos fenótipos do corpo de um mamífero. Um objetivo central da biologia do século XXI é relacionar o funcionamento desse grande repertório de genes com a fisiologia do organismo, a biologia do desenvolvimento e o desenvolvimento das doenças. A complexidade desse problema é ilustrada pelo fato de que existem pelo menos várias centenas de diferentes tipos celulares dentro do corpo de um mamífero, cada um com seu próprio comportamento, seu próprio metabolismo distinto e sua própria fisiologia.

Essa complexidade é adquirida durante o processo de desenvolvimento do organismo, e seu estudo é o campo de ação dos biólogos do desenvolvimento. Eles se debatem com um problema que

Barra lateral 1.5 Quantas proteínas diferentes podem ser encontradas no corpo humano? Embora alguns tenham se arriscado a estabelecer estimativas do número total de genes humanos (um pouco mais de 22.000), é difícil extrapolar desse número para o número total de diferentes proteínas codificadas no genoma humano. A estimativa mais simples parte da premissa de que cada gene codifica a estrutura de uma única proteína. Mas essa é uma suposição ingênua, pois ignora o fato de que o transcrito de pré-mRNA derivado de um único gene pode ser submetido a vários padrões de *splicing* alternativo, gerando mRNAs múltiplos e diferentemente estruturados, muitos dos quais podem, por sua vez, codificar proteínas distintas (veja a Figura 1.17). Assim, em algumas células, o *splicing* pode incluir certos éxons na molécula de mRNA final a partir de um gene, enquanto em outras células esses éxons podem estar ausentes. Tais padrões de *splicing* alternativo podem gerar mRNAs que possuem estruturas e seqüências codificadoras de proteínas muito diferentes. Em um caso admitidamente extremo, descobriu-se que um único gene de *Drosophila* é capaz de gerar 38.016 diferentes mRNAs, e, portanto, proteínas, por meio de vários *splices* alternativos de seu pré-mRNA; é provável que genes que possuem padrões de *splicing* alternativo similarmente complexos também existam em nosso próprio genoma.

Uma outra dimensão da complexidade deriva das modificações pós-traducionais das proteínas. As proteínas exportadas à superfície

celular ou liberadas em forma solúvel no espaço extracelular são geralmente modificadas pela ligação de complexos ramos de moléculas de açúcar durante o processo de **glicosilação**. As proteínas intracelulares freqüentemente sofrem outros tipos de modificações químicas. As proteínas envolvidas na transdução dos sinais que regem a proliferação celular com freqüência sofrem **fosforilação** pela ligação covalente de grupos fosfato a resíduos dos aminoácidos serina, treonina ou tirosina. Similarmente, as histonas que enrolam o DNA e controlam seu acesso às RNA polimerases (que sintetizam hnRNA) estão sujeitas à **acetilação**, bem como a modificações pós-traducionais mais complexas.

As cadeias polipeptídicas que formam as proteínas também podem sofrer clivagem em sítios específicos logo após seu agrupamento inicial, muitas vezes gerando pequenas proteínas com funções não aparentes nas proteínas precursoras não-clivadas. Posteriormente, descobriremos como certos sinais podem ser transmitidos através da célula via uma cascata de enzimas que clivam proteínas denominadas proteases. Nesses casos, a proteína A pode clivar a proteína B, ativando sua atividade de protease previamente latente; uma vez ativada, a proteína B pode clivar a proteína C, e assim por diante. Em conjunto, o *splicing* alternativo e as modificações pós-traducionais das proteínas geram muito mais diferentes moléculas de proteínas do que o número aparente de genes no genoma humano.

é inerente à organização de todos os organismos multicelulares. Todas as células no corpo de um animal são descendentes lineares de um óvulo fertilizado. Além disso, quase todas as células carregam genomas que são cópias razoavelmente precisas do genoma inicialmente presente nesse óvulo fertilizado (veja a Barra lateral 1.4). O fato de que as células de todo o corpo são fenotipicamente bastante distintas umas das outras (p. ex., uma célula de pele *versus* uma célula de cérebro), embora sejam geneticamente idênticas, cria esse problema central à biologia do desenvolvimento: como esses vários tipos celulares adquirem diferentes fenótipos, se eles carregam matrizes genéticas idênticas? A resposta, documentada em milhares de formas durante as três décadas passadas, está na leitura seletiva do genoma por diferentes tipos celulares (Figura 1.18).

À medida que as células no embrião precoce passam por repetidos ciclos de crescimento e divisão, células localizadas em diferentes partes do embrião começam a assumir fenótipos distintos, sendo esse o processo de **diferenciação**. As células em diferenciação se tornam comprometidas a formar um tipo de tecido em vez de outro – por exemplo, intestino em oposição a sistema nervoso. Ao mesmo tempo, elas mantêm o mesmo conjunto de genes. Tal discrepância leva a uma conclusão simples: mais cedo ou mais tarde, a diferenciação deve ser entendida no sentido dos conjuntos de genes que são expressos (i.e., transcritos) em algumas células, mas não em outras.

Ao ser expresso em um tipo celular particular, um conjunto de genes dita a síntese de uma corte de proteínas que colaboram para criar um fenótipo celular específico. Consequentemente,

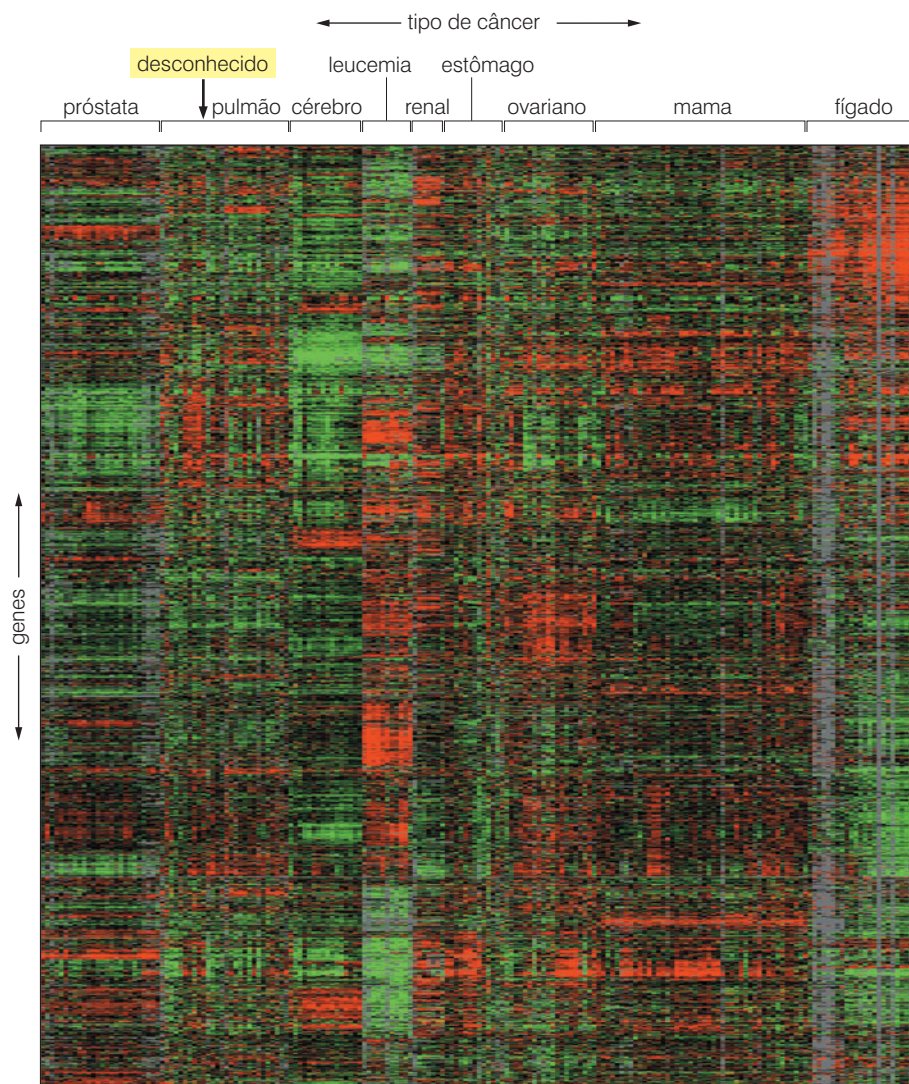


Figura 1.18 Exame global de arranjos de expressão gênica O desenvolvimento dos microarranjos de expressão gênica tornou possível o exame dos níveis de expressão de centenas, e mesmo milhares, de genes dentro de um dado tipo de célula. Nesta imagem, níveis de expressão acima da média são indicados como pequenas barras vermelhas, enquanto níveis abaixo da média são indicados como pequenas barras verdes. Os mRNAs de 142 diferentes tumores humanos (*arranjados da esquerda para a direita*) foram analisados. Em cada caso, mediram-se os níveis de expressão de 1.800 genes humanos selecionados (*de cima para baixo*). Cada classe de tumores tem seu espectro característico de genes expressos. Neste caso, um tumor de tipo desconhecido (*marca amarela*) foi considerado um câncer de pulmão, pois seu padrão de expressão gênica era similar aos de uma série de cânceres de pulmão identificados. (Cortesia de P. O. Brown, D. Botstein e The Stanford Expression Collaboration.)

mente, o fenótipo de cada tipo de célula diferenciada no corpo deve, em princípio, ser compreensível em termos do subconjunto específico de genes expresso naquele tipo celular.

Os genes nas células mamíferas podem ser agrupados em duas classes gerais – os genes *housekeeping* e os **tecido-específicos**. Muitos genes codificam proteínas universalmente requeridas para manter a viabilidade de todos os tipos celulares em todo o corpo ou para desempenhar certas funções biológicas comuns a todos os tipos celulares. Esses genes expressos em comum são classificados como genes *housekeeping*. Em um dado tipo celular diferenciado, os genes *housekeeping* representam a grande maioria dos genes expressos.

Uma minoria de genes dentro de uma célula diferenciada – os genes tecido-específicos – se dedica à produção de proteínas e, portanto, fenótipos especificamente associados a essa célula diferenciada. É possível, por exemplo, que dentro de um dado tipo celular diferenciado, 10.000 a 15.000 genes *housekeeping* sejam expressos, ao passo que menos de 1.000 genes tecido-específicos sejam responsáveis pelas características distintas e diferenciadas da célula. Por dedução, em cada tipo de célula diferenciada, uma proporção significativa dos cerca de 20.000 genes no genoma não é expressa, uma vez que eles não são necessários nem ao programa específico de diferenciação da célula nem para propósitos de sua manutenção geral.

1.8 Os fatores de transcrição controlam a expressão gênica

A descrição anterior da diferenciação torna claro que grandes grupos de genes devem ser coordenadamente expressos, enquanto outros genes devem ser reprimidos, a fim de que as células exibam fenótipos complexos e tecido-específicos. Essa coordenação da expressão é tarefa dos **fatores de transcrição** (TFs). Essas proteínas se ligam a seqüências específicas de DNA presentes na região de controle de cada gene e determinam se o gene será ou não transcrito. O trecho específico de seqüência de nucleotídeos ao qual os TFs se ligam, frequentemente chamado de **motivo de seqüência**, costuma ser bastante curto, tendo tipicamente 5 a 10 nucleotídeos de extensão. De forma ainda não completamente compreendida no nível molecular, alguns TFs dão à enzima RNA polimerase, responsável pela execução da transcrição, acesso a um gene. Porém, outros TFs podem bloquear tal acesso e, assim, garantir que um gene seja transcricionalmente reprimido.

A região de controle dentro de um gene contém uma série de seqüências curtas de nucleotídeos de DNA reconhecidas por alguns fatores de transcrição especializados, que passam a se ligar a elas e, então, a exercer controle sobre o processo de transcrição (Figura 1.19). Portanto, a presença ou ausência dessas seqüências curtas de DNA (muitas vezes denominadas **estimuladoras**) determina se um fator de transcrição pode ou não se ligar à região de controle de um gene e impor controle. Em geral, as seqüências de controle se situam imediatamente *upstream* ao sítio, dentro do gene, em que começa a transcrição. Além disso, uma região definida próxima ao sítio de início da transcrição, denominada **promotor**, está ligada à RNA polimerase e é um agrupamento de fatores de transcrição gerais. Por conseguinte, um gene pode ser separado em duas regiões funcionalmente significativas – as seqüências de controle não-transcritas e as seqüências transcritas, representadas pelas moléculas de pré-mRNA e mRNA. Em muitos genes, contudo, seqüências estimuladoras também podem estar espalhadas dentro da região transcrita do gene, com freqüência em íntrons.

Os fatores de transcrição podem exercer muito poder, visto que um único TF pode simultaneamente afetar a expressão de um grande conjunto de genes responsivos *downstream*, cada um carregando, em seu promotor, as seqüências de reconhecimento (um estimulador) para o fator em questão. A capacidade de um único TF (ou de um único gene que especifica esse TF) de produzir mudanças múltiplas dentro de uma célula ou um organismo é geralmente denominada **pleiotropia**. No caso das células cancerosas, um TF que atua pleiotropicamente e esteja funcionando mal pode orquestrar, de forma simultânea, a expressão de um grande conjunto de genes responsivos que, juntos, passam a criar o fenótipo da célula cancerosa.

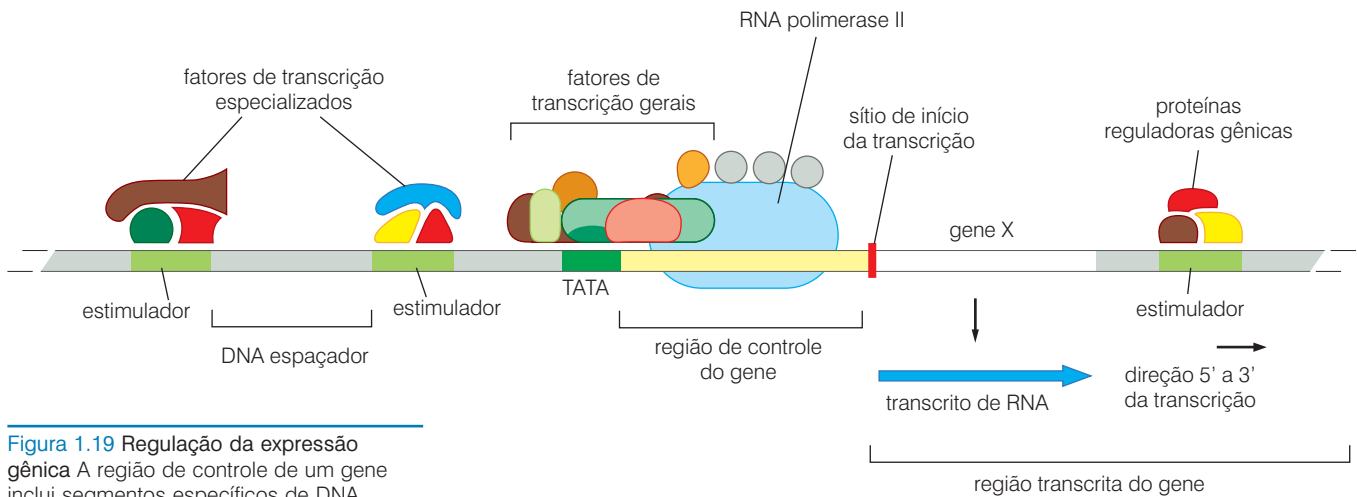


Figura 1.19 Regulação da expressão gênica A região de controle de um gene inclui segmentos específicos de DNA (verde-claro), aos quais se ligam proteínas reguladoras gênicas conhecidas como fatores de transcrição (TFs), geralmente como complexos multiprotéicos. Além disso, o *promotor* do gene (verde-escuro, amarelo) contém sequências às quais a RNA polimerase II (pol II) pode se ligar com fatores de transcrição gerais associados. Os fatores de transcrição ligados podem influenciar a estrutura da cromatina (notavelmente as histonas, que empacotam o DNA cromossômico), criando um ambiente localizado que permite à pol II iniciar e estender um transcrito de RNA (seta azul). (Os fatores de transcrição gerais estão envolvidos na inicialização da transcrição de muitos genes ao longo do genoma, enquanto os fatores de transcrição especializados estão envolvidos na regulação da expressão de pequenos subconjuntos de genes.) Algumas sequências reguladoras (às vezes denominadas *estimuladoras*) podem estar localizadas dentro da região transcrita de um gene. (De B. Alberts et al., *Molecular Biology of the Cell*, 4th ed. New York: Garland Science, 2002.)

A transcrição da maioria dos genes depende das ações de vários TFs distintos, que devem se acomodar juntos, cada um em seu sítio de sequência apropriado (i.e., estimulador) ou próximo do promotor do gene, e colaborar para ativar a expressão gênica. Essas interações injetam outro elemento em nosso modo de pensar – que a expressão de um gene é, na maioria das vezes, resultado das ações combinatórias de vários TFs. Portanto, a expressão coordenada de múltiplos genes dentro de uma célula, muitas vezes chamada de seu **programa de expressão** gênica, depende das ações de múltiplos TFs atuando de forma combinada sobre um grande número de promotores gênicos.

1.9 Os metazoários são formados por componentes conservados durante imensos períodos do tempo evolutivo

Essas descrições da biologia celular, da genética e da evolução são em parte informadas por nosso conhecimento da história da vida na Terra. Os metazoários provavelmente surgiram somente uma vez durante a evolução da vida nesse planeta, talvez há 700 milhões de anos. Uma vez desenvolvidos os principais mecanismos que governam sua genética, bioquímica e desenvolvimento embrionário, esses mecanismos permaneceram predominantemente inalterados nos organismos descendentes até o presente. Esse compartilhamento de características conservadas entre vários filos animais tem profundas consequências para a pesquisa do câncer, visto que se provou que muitas lições aprendidas a partir do estudo de organismos mais primitivos, mas geneticamente maleáveis, como moscas e vermes, são diretamente transferíveis à nossa compreensão de como os tecidos mamíferos, incluindo os de humanos, se desenvolvem e funcionam.

Após examinar os diversos organismos agrupados dentro da classe dos mamíferos, descubra-se que as diferenças na bioquímica e biologia celular são mínimas. Por essa razão, ao longo deste livro, nos moveremos sem esforço, de lá para cá, entre a biologia de camundongos e a biologia de humanos, tratando-as como se fossem essencialmente idênticas. Ocasionalmente, quando diferenças espécie-específicas forem importantes, essas serão ressaltadas.

Os complexos circuitos de sinalização que operam dentro das células parecem estar organizados de modo virtualmente idêntico nas células de todos os tipos de mamíferos. Ainda mais espetacular é a intercambialidade das partes componentes. É raro que uma proteína humana não funcione no lugar de sua proteína *ortóloga* equivalente (veja a Barra lateral 1.6) em células de camundongo. No caso de muitos tipos de proteínas, essa conservação tanto de estrutura como de função é tão profunda que as proteínas podem ser trocadas entre organismos separados por distâncias evolutivas ainda maiores. Um exemplo impressionante disso, anteriormente mencionado (veja a Figura 1.7), é dado pelo gene *e*, portanto, pela proteína que especifica a formação de olhos em mamíferos e em moscas.

1.10 As técnicas de clonagem gênica revolucionaram o estudo das células normais e malignas

Até a metade da década de 1970, a análise molecular dos genes de mamíferos estava em grande parte confinada aos genomas de vírus de tumor de DNA, vírus descritos posteriormente, no Capítulo 3. Esses vírus possuem genomas relativamente simples, que se acumulam em alto número de cópias (i.e., número de moléculas) por célula. Isso possibilitou que os biólogos prontamente purificassem e estudassem a estrutura detalhada e o funcionamento dos genes virais, que operam de forma muito semelhante aos genes das células hospedeiras em que tais vírus se multiplicavam. Em contraste, a análise molecular dos genes celulares era essencialmente impossível, uma vez que há muitos deles (dezenas de milhares por genoma haplóide) e eles estão incrustados em um genoma de complexidade intimidante (~3,2 bilhões de pares de bases de DNA por genoma celular haplóide).

Tudo isso mudou com o advento da clonagem gênica. Daí em diante, os genomas celulares puderam ser fragmentados e usados para criar coleções de fragmentos de DNA conhecidas como **bibliotecas** genômicas. Várias técnicas de hibridização de DNA puderam então ser usadas para identificar os fragmentos genômicos dentro dessas bibliotecas, que eram de especial interesse ao experimentador, em particular o fragmento de DNA que carregava parte de ou todo um gene em estudo. A recuperação de tal fragmento da biblioteca e a amplificação desse fragmento recuperado em milhões de cópias idênticas gerava um fragmento de DNA purificado e **clonado**, e, assim, um gene clonado (Figura 1.21).

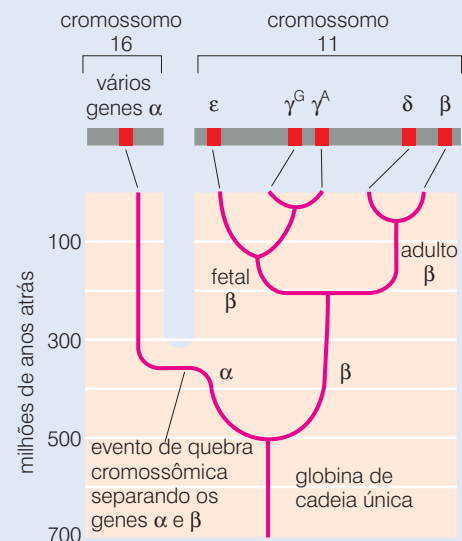
Barra lateral 1.6 Ortólogos e homólogos Todos os vertebrados superiores (aves e mamíferos) parecem ter números comparáveis de genes – na faixa de 25.000. Além disso, quase todo gene presente no genoma de aves parecer ter um equivalente intimamente relacionado no genoma humano. A correspondência entre os genes de camundongo e humanos é ainda maior, devido ao parentesco evolutivo mais próximo dessas duas espécies de mamíferos.

Dentro do genoma de qualquer espécie única, existem genes claramente relacionados um ao outro quanto a seu conteúdo de informação e às estruturas relacionadas das proteínas que especificam. Tais genes formam uma **família gênica**. Por exemplo, o grupo de genes no genoma humano que codifica as globinas constitui um grupo desse tipo. É evidente que esses genes relacionados surgiram em algum ponto do passado evolutivo através de ciclos repetidos do processo em que um gene existente é duplicado, seguido pela divergência, uma da outra, das duas seqüências de nucleotídeos duplicadas (Figura 1.20). Diz-se que genes relacionados um ao outro dentro do genoma de uma mesma espécie ou genes relacionados um ao outro nos genomas

de duas espécies distintas são **homólogos** um ao outro. Muitas vezes, o equivalente preciso de um gene no homem pode ser encontrado no genoma de outra espécie. Diz-se que esses dois genes intimamente relacionados são **ortólogos** um do outro. Assim, o equivalente preciso – o ortólogo – do gene *c-myc* em humanos é o gene *c-myc* em galinhas. Na medida em que existem outros genes semelhantes a *myc* transportados pelo genoma humano (p. ex., *N-myc* e *L-myc*), os últimos são membros da mesma família gênica, como *c-myc*, mas não são ortólogos um do outro ou do gene *c-myc* de galinhas.

Ao longo deste livro, iremos freqüentemente nos referir a genes sem fazer referência à espécie da qual foram isolados. Faz-se isso conscientemente, uma vez que, na grande maioria dos casos, o funcionamento de um gene de camundongo (e da proteína codificada) é indistinguível daquele de seu ortólogo humano ou de galinhas.

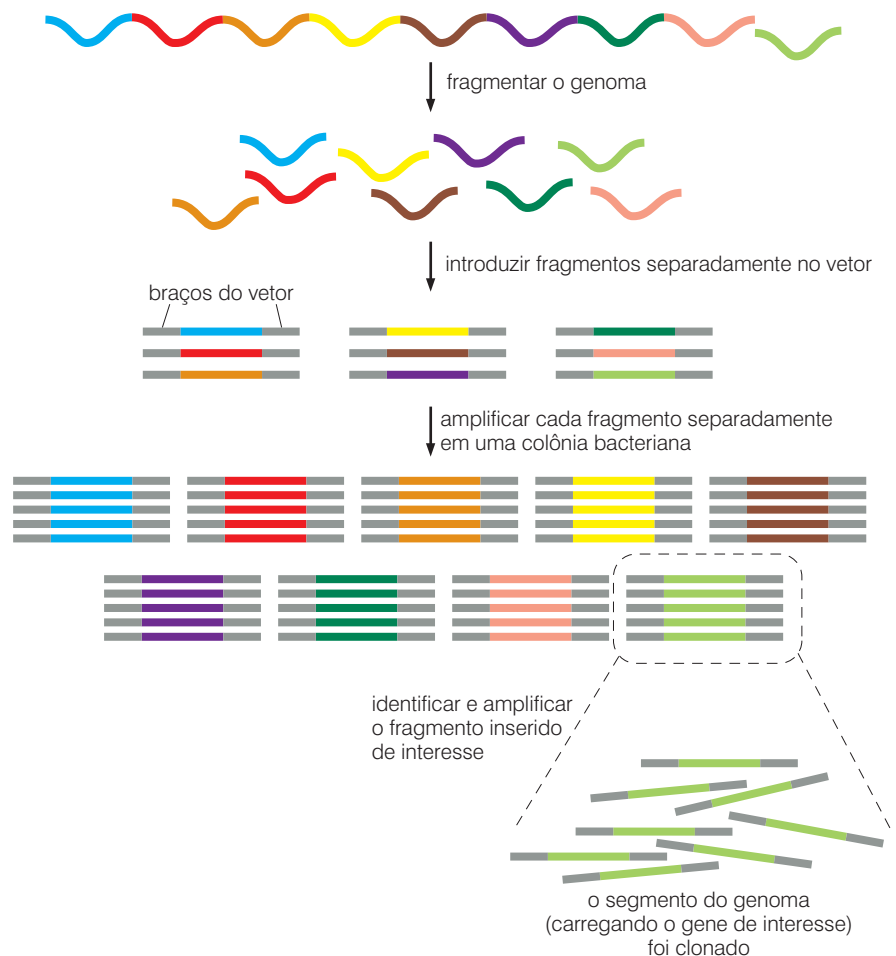
Figura 1.20 Desenvolvimento evolutivo de famílias gênicas A evolução da complexidade dos organismos foi possível, em parte, pelo desenvolvimento de proteínas crescentemente especializadas. Novas proteínas são “inventadas” em grande parte por um processo de duplicação gênica, seguido pelas evoluções separadas e divergentes dos dois genes resultantes. Repetidos ciclos de tais duplicações gênicas seguidos de divergência levaram ao desenvolvimento de um grande número de famílias multigênicas. Durante a evolução dos vertebrados, um gene ancestral de globina, aqui mostrado, que codificava a proteína componente da hemoglobina, foi repetidamente duplicado, levando a um grande número de diferentes genes de globina no moderno genoma dos mamíferos, os quais estão presentes em dois cromossomos humanos. Como essas globinas possuem diferentes seqüências de aminoácidos, cada uma pode servir a uma função fisiológica específica. (De B. Alberts et al., *Essential Cell Biology*, 2nd ed. New York: Garland Science, 2004.)



Contudo, outras técnicas foram usadas para gerar cópias de DNA dos mRNAs que são sintetizados no núcleo e exportados ao citoplasma, no qual servem de moldes para a síntese de proteínas. A descoberta da enzima **transcriptase reversa** (RT, veja a Barra lateral 3.1) foi de importância central nisso. O uso dessa enzima possibilitou sintetizar *in vitro* (i.e., em tubo de ensaio) cópias de DNA complementares às moléculas de mRNA. Essas moléculas de DNA, denominadas **cDNAs**, transportam a informação de sequência presente em uma molécula de mRNA após o evento de *splicing* que removeu todos os íntrons. Apesar de que iremos nos referir com frequência, ao longo deste livro, a clones de DNA das versões genômicas (i.e., cromossômicas) de genes e a cDNAs gerados dos transcritos de mRNA de tais genes, limitações de espaço impedem a descrição detalhada dos procedimentos de clonagem *per se*.

Para os pesquisadores do câncer, a clonagem gênica chegou exatamente na hora certa. Como veremos nos próximos capítulos, a pesquisa, na década de 1970, diminuiu a candidatura dos vírus de tumor como causa da maioria dos cânceres humanos. À medida que esses vírus saíram do centro do palco, os genes celulares tomaram seu lugar como os mais importantes agentes responsáveis pela formação dos tumores humanos. O estudo desses genes teria sido impossível sem a nova tecnologia de clonagem gênica desenvolvida, que se tornou amplamente disponível no final da década de 1970, exatamente quando foi necessária ao propósito da comunidade científica de descobrir as causas basais do câncer.

Figura 1.21 Clonagem molecular de genes
Muitas versões do procedimento de clonagem gênica foram desenvolvidas após essa tecnologia ter sido primeiramente inventada no início e na metade da década de 1970. A figura mostra um esquema de uma versão desse processo, em que um segmento específico de DNA (p. ex., contendo um gene de interesse) é isolado de um genoma complexo, como o humano. O genoma é fragmentado em segmentos relativamente pequenos, em geral com várias dezenas de quilobases de extensão (*parte superior*); cada segmento de DNA é individualmente inserido em um vetor (*braços cinzas*) pela ligação ao DNA do vetor, gerando um vetor recombinante; cada um dos DNAs resultantes vetor + inserto é então independentemente inserido em uma bactéria. Cada bactéria carregando um vetor + segmento de gene inserido é então expandida em uma colônia bacteriana contendo muitos milhares de bactérias, a colônia bacteriana transportando o gene de interesse é identificada e o vetor transportando o gene de interesse é recuperado, gerando milhões de cópias desse fragmento genômico (*parte inferior direita*).





CAPÍTULO 2

A Natureza do Câncer

“Quando publiquei os resultados dos meus experimentos, em 1902, no desenvolvimento de ovos de ouriço do mar duplamente fertilizados, contribui com a sugestão de que tumores malignos poderiam ser o resultado de uma condição cromossomal anormal, que possivelmente surgiu da mitose multipolar... Assim, desenvolvi por muito tempo o tipo de experimentos que sugeri, e até hoje não se obteve sucesso, mas minha convicção permanece inabalável.”

Theodor Boveri, patologista, 1914

A organização celular do tecido de metazoário tornou possível a extraordinária evolução da diversidade de desenhos anatômicos. Muito dessa plasticidade nos desenhos deve-se ao fato de que as construções de blocos de tecidos e construções de órgãos com células individuais são favorecidas com imensa autonomia e versatilidade. A maior parte dos tipos celulares no organismo de um metazoário carrega em si um genoma completo, o que corresponde a muito mais informação do que aquela necessária por qualquer uma dessas células. Muitas células compreendem a habilidade de crescer e se dividir mesmo depois do organismo já desenvolvido. Essa habilidade de se proliferar e participar da **morfogênese** (criar forma) tecidual é o que permite a manutenção do tecido adulto ao longo da vida do indivíduo. Tal manutenção pode envolver o reparo de lesões, assim como a reposição de células que sofreram desgaste devido a sua atividade por um longo período.

Ao mesmo tempo, essa versatilidade e autonomia possuem grande risco, visto que células individuais do organismo podem ter acesso a informações em seu genoma às quais normalmente não teriam. Além disso, suas seqüências de genes servem de alvo para diversos mecanismos que alteram sua estrutura e, assim, a informação contida no genoma. Os resultados das mutações gênicas podem divergir em novas células, as quais normalmente terão fenótipos anormais; essas alterações podem ser incompatíveis com as funções celulares normais no que diz respeito à organização estrutural e fisiológica. Dentre essas alterações impróprias, podem ocorrer alterações nos programas de crescimento celular, as quais podem levar ao surgimento de grandes populações de células que não obedecem às regras de construção e manutenção de um tecido normal.

Quando reveladas assim, as células renegadas, que formam o tumor, são o resultado do desenvolvimento normal que ocorreu de maneira incorreta, pois, mesmo o organismo possuindo mecanismos de defesa para evitar seu surgimento, as células cancerosas sempre encontram alguma maneira de se esquivar e sobreviver – elas são focadas a exercer uma única função, de simplesmente multiplicar-se. Enquanto isso, as células normais são cuidadosamente programadas para participar na construção dos diversos tecidos que tornam possível a sobrevivência do organismo.

2.1 Tumores surgem a partir de tecidos normais

A confluência de descobertas nos meados do século XIX conduziu ao conhecimento que hoje temos sobre como tecidos e organismos complexos se formam a partir de óvulos fertilizados. Dentre tais descobertas, a de maior importância é a de que todos tecidos são compostos por células e produtos celulares e que todas as células surgem a partir da divisão celular de uma célula preexistente. Levando em consideração tais questões, pode-se deduzir que todas as células que formam um organismo complexo são membros de linhagens celulares provenientes de um óvulo fertilizado. Por outro lado, o ovo fertilizado é capaz de originar todas as células do corpo, fazendo-o por meio de repetidos ciclos de divisão e crescimento celular.

Esses fatos tiveram grandes impactos na maneira como se estudaram os tumores. Previamente o que se sabia era que tumores eram corpos estranhos que se instalavam no organismo de um indivíduo debilitado. Hoje sabe-se que tumores, assim como tecidos saudáveis, podem ser examinados sob o microscópio pelos pesquisadores na ciência da **histologia** (ou **histopatologia**). Esses estudos, primeiro de seções de tecidos normais (fatias finas) e, mais tarde, de seções feitas a partir de massas tumorais, revelaram que tumores, assim como tecidos normais, são compostos por massas de células (Figura 2.1).

Além disso, evidências contribuíram com o fato de que tumores de vários tipos, em vez de invadirem o corpo pelo lado de fora, em geral derivam diretamente dos tecidos normais nos quais eles foram primeiramente descobertos. Entretanto, os tumores pareceram ser capazes de se movimentar pelo corpo humano: em diversos pacientes, muitos tumores foram descobertos em locais anatômicos bastante distantes do local onde iniciou a doença, uma consequência da capacidade que o câncer possui de se espalhar pelo corpo e encontrar novas colônias de células cancerosas (Figura 2.2). Esses novos assentamentos, denominados **metástases**, eram, com frequência, rastreados diretamente de volta para o local onde a doença do câncer iniciou – tumor fundador ou **tumor primário**.

Invariavelmente, a análise detalhada da organização de células contidas nas massas tumorais mostrou evidências de uma arquitetura tecidual que era menos organizada e estruturada do

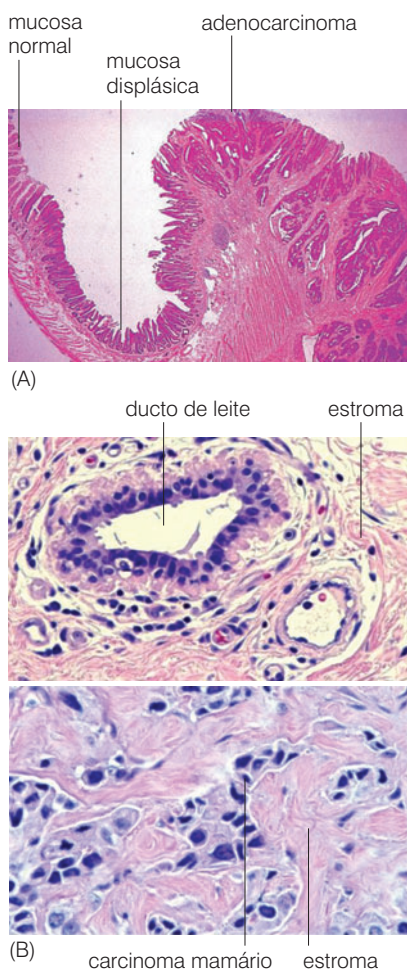
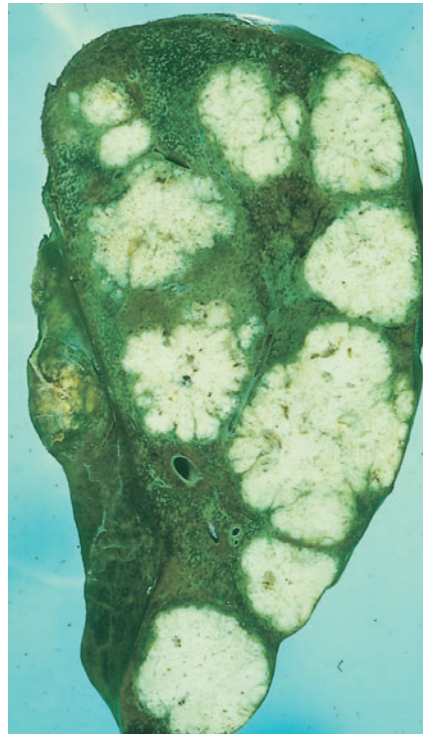


Figura 2.1 Tecido normal versus neoplásico (A) Corte histológico da linha do íleo do intestino delgado visto por uma baixa magnitude revela a continuidade entre o tecido normal e o canceroso. A esquerda mostra a linha epitelial normal, denominada mucosa. No meio, está o tecido da mucosa altamente anormal, denominado displásico. À direita, um tumor – um adenocarcinoma – que já começou a invadir tecidos subjacentes. (B) Esse par de seções de tecido mamário humano, vistos a uma alta magnitude, mostram como a arquitetura do tecido normal fica desordenada em tumores. Na glândula mamária normal (*foto superior*), um ducto de leite está delineado por células epiteliais (*núcleo roxo escuro*). Esses ductos estão circundados por tecido mesenquimal denominado “estroma”, que consiste em células do tecido conjuntivo, como fibroblastos e adipócitos e matriz de colágeno (*rosa*). Em um carcinoma invasivo de ducto mamário (*foto inferior*), as células cancerosas provenientes das células epiteliais de ductos normais possuem seus núcleos maiores (*roxo*) do que o normal, não formam mais os ductos bem-estruturados e invadiram o estroma (*rosa*). (A; de A. T Skarin, Atlas of Diagnostic Oncology, 3rd ed. Philadelphia: Elsevier Science Ltd., 2003; B, cortesia de A. Orimo.)



(A)



(B)



(C)

que a arquitetura de tecidos normais ao redor (veja a Figura 2.1). Tais comparações histopatológicas forneceram as primeiras sementes de uma idéia que tomaria grande parte do século XX para ser provada: tumores são formados por células que perderam sua habilidade para montar e criar tecidos de forma e função normais. Em outras palavras, o câncer passou a ser visto como a doença do mau funcionamento celular.

Em princípio, todos os tumores deveriam ser rastreáveis de volta para o tecido ou órgão específico no qual surgiram primeiro, com frequência por meio de análises histopatológicas de seções de tumores para prover dicas críticas. Essa idéia simples levou pela primeira vez a um novo caminho para classificar esses crescimentos, que dependem dos seus presumíveis tecidos de origem. As classificações resultantes frequentemente uniram sob um mesmo teto cânceres que surgem em tecidos ou órgãos que têm funções radicalmente diferentes no corpo, mas compartilham tipos de organização tecidual.

A ciência da histopatologia também permitiu o entendimento do relacionamento entre o comportamento clínico de um tumor (i. e., os efeitos do tumor no paciente) e suas características microscópicas. O fato mais importante é o critério que segregou os tumores em duas categorias gerais de acordo com o grau de agressividade de seu crescimento. Aqueles que cresceram localizados sem invasão a tecidos adjacentes foram classificados como **benignos**. Outros que invadiram tecidos próximos e espalharam metástases foram chamados de **malignos**.

Na realidade, a maior parte de tumores primários que aparecem em humanos são benignos e, portanto, inofensivos ao seu hospedeiro, exceto nos casos raros em que a expansão dessas massas localizadas gera uma pressão em um tecido ou órgão vital. De qualquer forma, alguns tumores benignos podem causar problemas clínicos por liberarem altos níveis de hormônios que geram desequilíbrios fisiológicos no organismo. Por exemplo, **adenomas** de tireóide (crescimentos epiteliais pré-malignos) podem causar liberação excessiva do hormônio da tireóide na circulação, levando a um hipertireoidismo; os adenomas pituitários podem liberar hormônios de crescimento na circulação, levando ao crescimento excessivo de alguns tecidos – uma condição conhecida como **acromegalia**. Ape-

Figura 2.2 Metastase de células cancerosas para locais distantes. Diversos tipos de tumores finalmente liberam células cancerosas que migram para locais distantes no corpo, nos quais formam os tumores secundários conhecidos como metástases. (A) A metástase pode ser facilmente estudada no camundongo, no qual a localização das células do melanoma pode ser apontada por causa da sua coloração escura. A figura mostra os pulmões de um camundongo nos quais a formação de metástases foi quase que totalmente bloqueada (*esquerda*) e uma na qual centenas de metástases (*pontos pretos*) foram formadas, como observado duas semanas depois que células de melanoma de camundongo B16 foram introduzidas, via injeção, na veia da cauda de um camundongo (*direita*). (B) Metástases (*branco*) no fígado frequentemente surgem em pacientes com carcinomas avançados de cólon. A veia porta, que drena o sangue do cólon para o fígado, fornece uma rota para as células cancerosas de cólon metastáticas migrarem diretamente para o fígado. (C) O câncer de mama frequentemente faz metástase no cérebro. Aqui, grandes metástases são reveladas após a morte no lado direito do cérebro, no qual a duramáter do cérebro (camada de revestimento) foi removida (*direita*). (A, de F. Nimmerjahn et al. *Immunity* 23:41-51, 2005; B, cortesia de Peter Isaacson; C, A. T Skarin, *Atlas of Diagnostic Oncology*, 3rd ed. Philadelphia: Elsevier Science Ltd., 2003.)

sar de tudo, mortes causadas por tumores benignos não são comuns. A maior parte das mortalidades relacionadas ao câncer é causada por tumores malignos. Mais especificamente, são as metástases espalhadas por estes tumores que são responsáveis por cerca de 90% dos óbitos causados por câncer.

2.2 Os tumores surgem a partir de vários tipos celulares especializados ao longo do corpo

A maioria dos tumores humanos se desenvolve a partir de tecidos epiteliais. O **epitélio** são camadas de células que delineiam as paredes de cavidades e canais ou, no caso da pele, servem como cobertura externa do corpo. Nas primeiras décadas do século XX uma análise histológica detalhada revelou que tecidos normais que contêm epitélio são todos similarmente estruturados. Assim, abaixo das camadas de células epiteliais em cada um desses tecidos encontra-se uma **membrana basal** (também chamada de **lâmina basal**); ela separa as células epiteliais de suas subcamadas de células de tecido conjuntivo de suporte, chamado de **estroma** (Figura 2.3).

A membrana basal é um tipo celular especializado de matriz extracelular (ECM) e é formada por proteínas bastante secretadas pelas células epiteliais. Ainda outros tipos de membranas basais estão presentes em outros tipos de tecidos. Por exemplo, as células **endoteliais**, que formam o revestimento interno de capilares e de vasos maiores, localizadas sobre uma membrana basal especializada que as separa de uma camada externa de células especializadas da musculatura lisa. Em todos os casos, essas membranas basais servem como um esqueleto

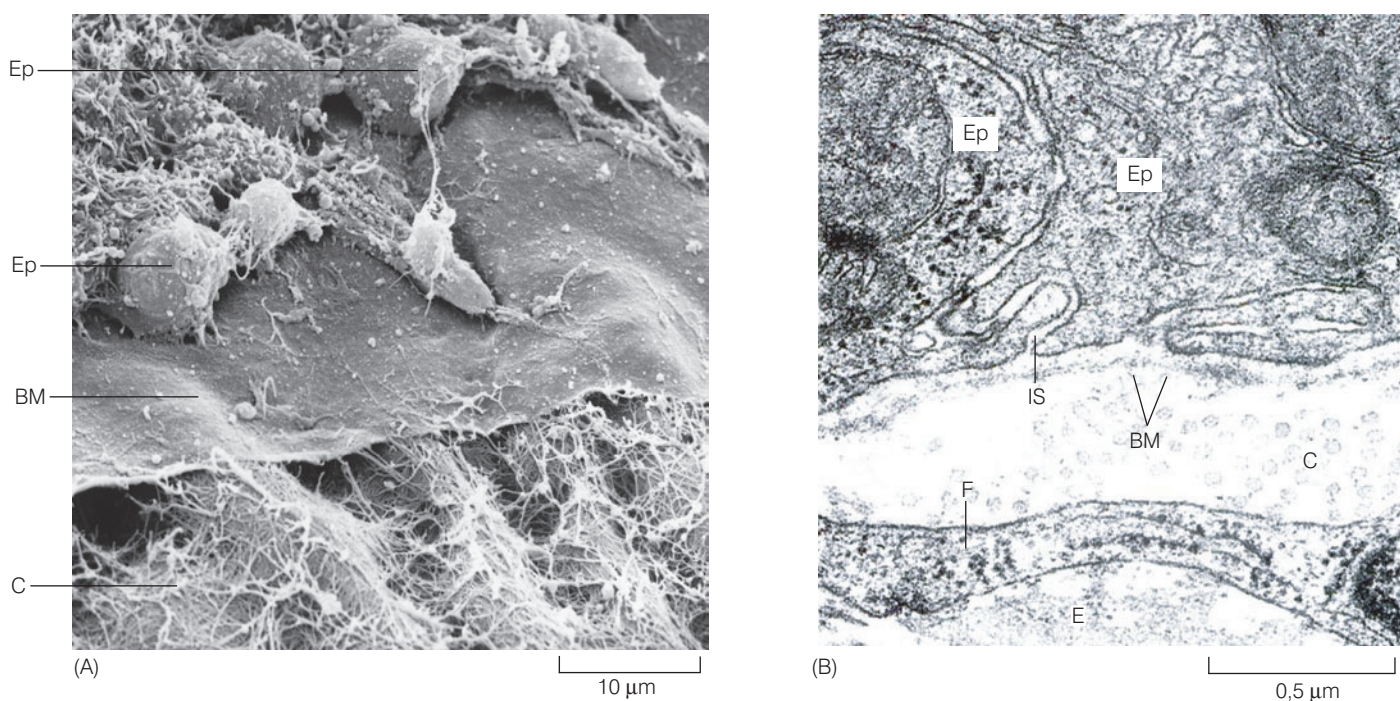


Figura 2.3 Membranas basais (A) Microscopia eletrônica de varredura de um epitélio de córnea de pinto ilustra o plano básico de tecidos epiteliais, no qual as células epiteliais (Ep) estão aglomeradas em um lado da membrana basal (BM). A BM, algumas vezes chamada de "lâmina basal", vista aqui como uma folha contínua, é formada por uma rede de proteínas da matriz extracelular. Abaixo destas, pode-se identificar as células do estroma e uma rede de fibras de colágeno (C) que ancoram a porção inferior da membrana basal à ECM do estroma. (B) Quando

observamos um corte histológico a uma maior magnitude em um microscópio eletrônico de transmissão do epitélio de traquéia de camundongo, a membrana basal (BM) pode ser visualizada. Diversas células epiteliais (Ep) são vistas acima da BM, ao passo que, abaixo, se observa as fibrilas de colágeno (C), fibroblasto (F) e fibras de elastina (E). Note que a membrana basal não é interrompida no espaço intracelular (IS) (A, cortesia de Robert Trelstad; B, de B. Young *et al.*, *Wheater's Functional Histology*, 4th ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 2003.)

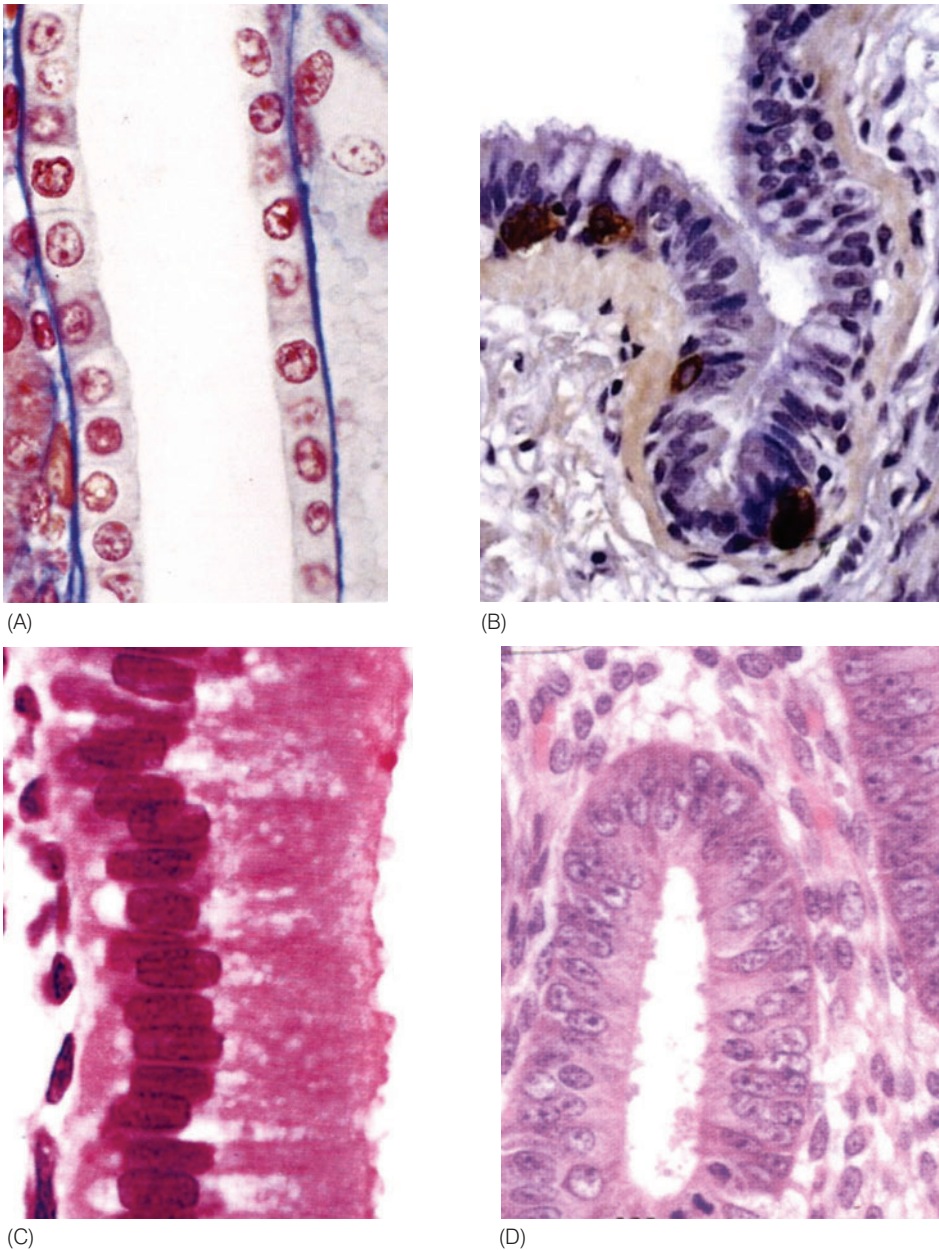


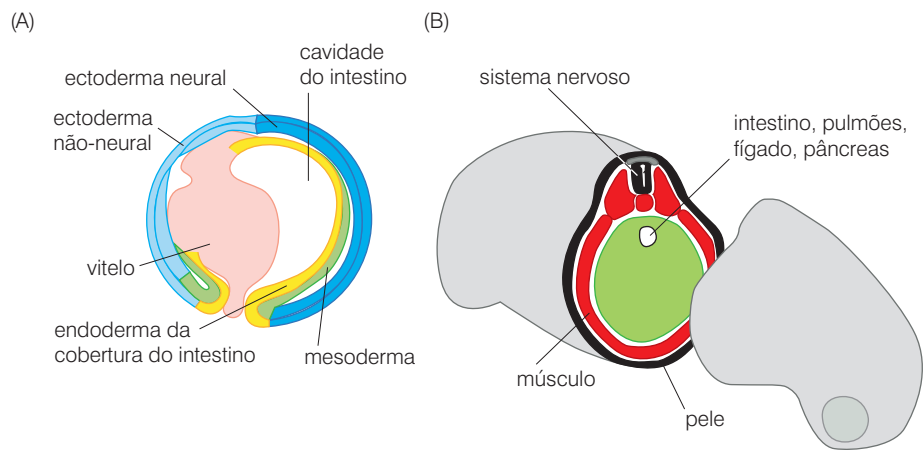
Figura 2.4 Arquitetura dos tecidos epiteliais. Um plano de organização comum descreve a maioria dos tecidos epiteliais presentes no corpo: as células epiteliais maduras, diferenciadas, estão na superfície exposta de um epitélio. Em diversos tecidos, abaixo desse epitélio, estão as células epiteliais menos diferenciadas, não-mostradas nesta figura. Abaixo da camada de células epiteliais encontra-se a membrana basal (Figura 2.3), que é de difícil visualização em um microscópio óptico. São mostrados os epitélios de (A) tubo coletor renal, (B) bronquíolo do pulmão, (C) epitélio colunar da vesícula biliar e (D) endométrio do útero. Em cada caso, as células epiteliais protegem o tecido subjacente do conteúdo da cavidade que eles revestem. (De B. Young et al., *Wheater's Functional Histology*, 4th ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 2003.)

estrutural do tecido. Além disso, como veremos mais adiante, células ligam uma série de moléculas sinalizadoras biologicamente ativas a membranas basais.

Os epitélios são de bastante interesse aqui, pois semeiam os tipos de cânceres humanos mais comuns – os **carcinomas**. Esses tumores são responsáveis por mais de 80% dos óbitos relacionados ao câncer no mundo ocidental. Dentre esses carcinomas, estão os tumores que se desenvolvem a partir das camadas celulares epiteliais do trato gastrointestinal – que inclui boca, esôfago, estômago, intestino delgado e grosso – assim como a pele, glândula mamária, pâncreas, pulmão, fígado, ovário, vesícula biliar e bexiga. Exemplos de tecidos epiteliais normais são mostrados na Figura 2.4.

Esse grupo de tecidos abrange tipos de células que se desenvolvem a partir das três principais camadas celulares primitivas na fase embrionária de vertebrados. Assim, o epitélio de pulmões, fígado, vesícula biliar, pâncreas, esôfago, estômago e intestinos é proveniente da camada celular interna, o **endoderma**. A pele se forma a partir da camada celular embrionária externa, chamada

Figura 2.5 Camadas celulares embrionárias. (A) Os tecidos de um metazoário mais complexo se desenvolvem a partir de três compartimentos de células embrionárias – ectoderma (azul), mesoderma (verde) e endoderma (amarelo). Cada uma dessas três camadas celulares embrionárias é precursora para tipos distintos de células diferenciadas. (B) Em um girino em estágio inicial, a pele e o sistema nervoso se desenvolvem a partir do ectoderma (cinza, preto) enquanto o tecido conjuntivo, incluindo ossos, músculos e as células formadoras do sangue se desenvolvem a partir do mesoderma (vermelho). O intestino e seus derivados, incluindo pulmão, pâncreas e fígado, se desenvolvem a partir do endoderma (branco). O desenvolvimento de todos os vertebrados segue este plano. (Adaptado de T. Mohun et al. *Cell* 22:9-15, 1980.)



de **ectoderma**, enquanto os ovários se originam embriologicamente a partir da camada do meio, o **mesoderma** (Figura 2.5). Portanto, no caso de carcinoma, sua classificação histopatológica não é informada por meio da história do desenvolvimento de seu tecido de origem.

As células epiteliais e estromais desses diversos tipos de tecidos colaboram na formação e manutenção das camadas epiteliais. Do ponto de vista evolutivo, parece que os mecanismos embrionários para organização e estruturação do tecido epitelial surgiram no início da evolução metazoária, provavelmente há mais de 600 milhões de anos, e esses princípios mecanicistas já foram explorados diversas vezes durante a evolução metazoária para construção de tecidos e órgãos que possuem uma ampla variedade de funções fisiológicas.

Grande parte dos carcinomas encaixa-se em duas principais categorias, que refletem as duas maiores funções biológicas associadas ao epitélio (Tabela 2.1). Algumas camadas epiteliais são muito úteis para selar a cavidade ou canal que revestem e para proteger as populações de células subjacentes. Tumores que se desenvolvem a partir de células epiteliais que formam essas camadas celulares protetoras são conhecidos como **carcinomas de célula escamosa**. Por exemplo, as células epiteliais que revestem a pele e o esôfago semeiam tumores desse tipo.

Muitos epitélios também possuem células especializadas que secretam substâncias nos ductos ou cavidades que eles revestem. Essa classe de células epiteliais gera os **adenocarcinomas**. Frequentemente esses produtos secretados são usados para proteger as camadas de células epiteliais dos conteúdos das cavidades que elas cercam (veja a Figura 2.6). Assim, algumas células epiteliais que revestem os pulmões e o estômago secretam camadas de muco que as protegem do ar (e de partículas aéreas) e do efeito corrosivo das altas concentrações de ácido, respectivamente. O epitélio, em alguns órgãos, como pulmões, útero e cérvix, têm a capacidade de originar adenocarcinomas puros ou carcinomas de células escamosas puros; com bastante frequência, entretanto, foi observada a coexistência de ambos os tipos de células de carcinomas nos tumores nesses órgãos.

Tabela 2.1 Carcinomas

(A) Sítios teciduais dos tipos mais comuns de adenocarcinoma	(B) Sítios teciduais dos tipos mais comuns de carcinomas de células escamosas	(C) Outros tipos de carcinomas
pulmão cólon mama pâncreas estômago esôfago próstata endométrio ovário	pele cavidade nasal orofaringe laringe pulmão esôfago cérvix	carcinoma pulmonar de célula pequena carcinoma pulmonar de célula grande carcinoma hepatocelular carcinoma de célula renal carcinoma de célula de transição (da bexiga urinária)

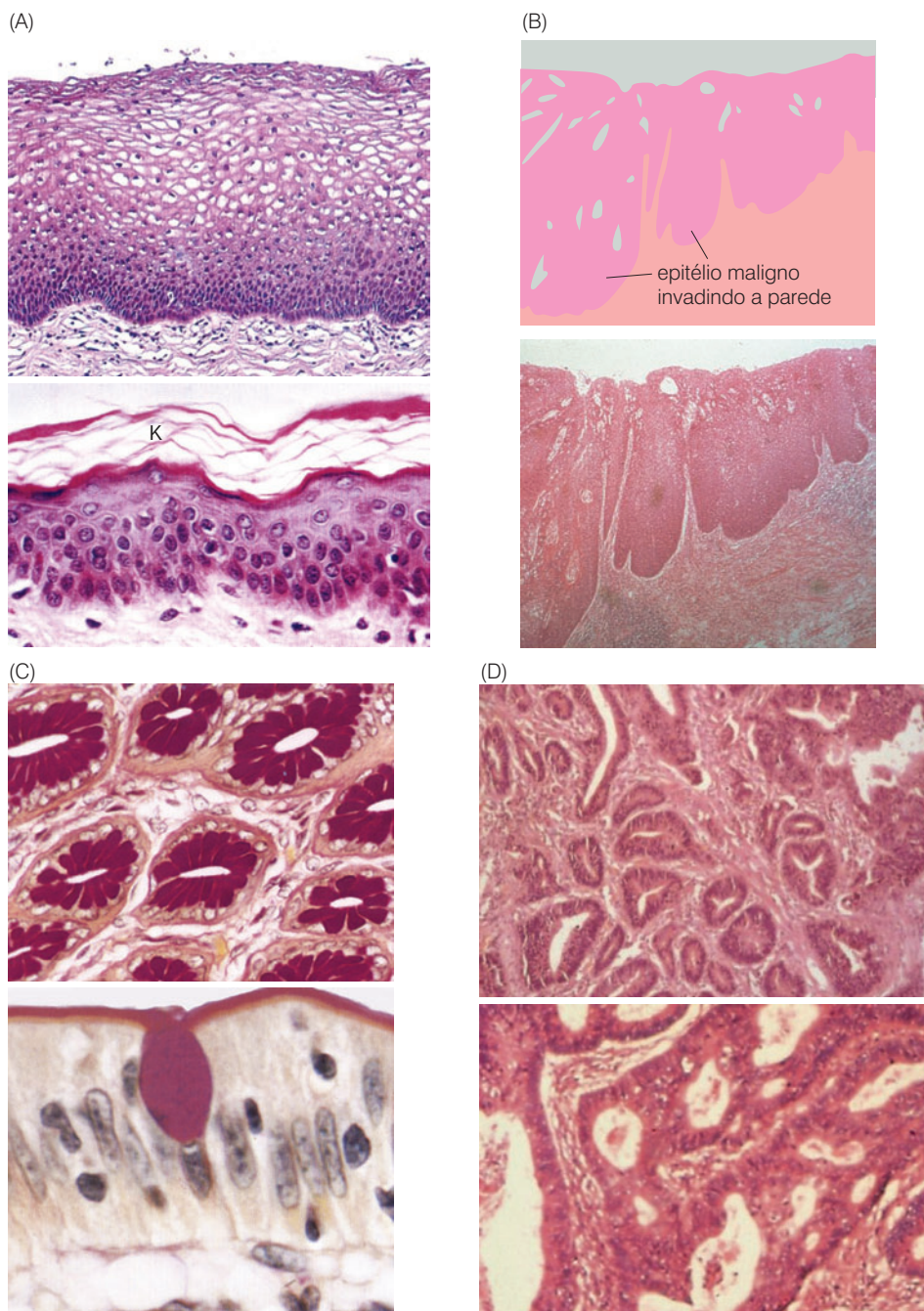


Figura 2.6 Epitélio e carcinomas derivados.

O epitélio pode ser classificado em subtipos dependendo da forma e função das células epiteliais normais e dos carcinomas que se originam destas. As origens dos carcinomas de célula escamosa e dos adenocarcinomas estão mostradas aqui. (A) Células escamosas normais em geral são achatadas e possuem a função de proteger o epitélio e tecidos subjacentes do conteúdo do lúmen ou, no caso da pele, proteger do ambiente externo. O epitélio escamoso do cérvix do útero (*acima*) e a pele (*abaixo*) são organizados de maneira bastante similar, com células maduras achatadas na superfície sendo continuamente esgotadas (p. ex., os queratinócitos [K] mortos da pele) e substituídas por células menos maduras produzidas logo abaixo. (B) Neste carcinoma de esôfago, grandes porções de células epiteliais malignas escamosas estão invadindo a subcamada do tecido estromal/mesenquimal. (C) Em alguns tecidos, células glandulares no epitélio secretam mucopolissacarídeos que protegem o epitélio; em outros tecidos, elas secretam proteínas que agem dentro da *lumina* (cavidades) dos ductos ou são distribuídas para locais mais distantes do organismo. As cavidades na parede do estômago são delineadas por células muco-secretoras (*vermelho-escuros, painel superior*). No epitélio do intestino delgado (*painel inferior*), uma única célula muco-secretora (*roxo*) está circundada por um terceiro tipo de células epiteliais – células colunares, que estão envolvidas na absorção de água. (D) Esses adenocarcinomas de estômago (*painel superior*) e de cólon (*painel inferior*) mostram múltiplos elementos de ductos, que são um claro indicativo de sua derivação a partir de epitélio secretor como aqueles no painel C. (A e C, de B. B. Young et al., *Wheater's Functional Histology*, 4th ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 2003; B e D, de A. T Skarin, *Atlas of Diagnostic Oncology*, 3rd ed. Philadelphia: Elsevier Science Ltd., 2003.)

O restante dos tumores malignos se desenvolve a partir de tecidos não-epiteliais ao longo do organismo. A principal classe de cânceres não-epiteliais deriva dos diversos tecidos conjuntivos, que possuem como origem o mesoderma do embrião (Tabela 2.2). Esses tumores, os **sarcomas**, representam apenas 1% dos tumores encontrados em clínicas oncológicas. Os sarcomas são derivados de diversos tipos de células **mesenquimais**. Incluídos entre estes estão os **fibroblastos** e as células do tecido conjuntivo relacionadas que secretam colágeno, maior componente estrutural da matriz extracelular dos tendões e da pele; os **adipócitos**, que armazenam gordura em seu citoplasma; os **osteoblastos**, que armazenam cristais de fosfato de cálcio nas matrizes de colágeno para formar osso; e os **miócitos** que formam músculo (Figura 2.7). O **angiossarcoma**, um tipo de tumor não comum, se desenvolve a partir de precursores das células epiteliais. As camadas de estroma do tecido epitelial incluem diversos tipos dessas células mesenquimais.

Tabela 2.2 Vários tipos dos sarcomas mais comuns

- osteossarcoma
- lipossarcoma
- leiomiossarcoma
- rabdomiossarcoma
- histiocitoma maligno fibroso
- fibrossarcoma
- sarcoma sinovial
- angiossarcoma
- condrossarcoma

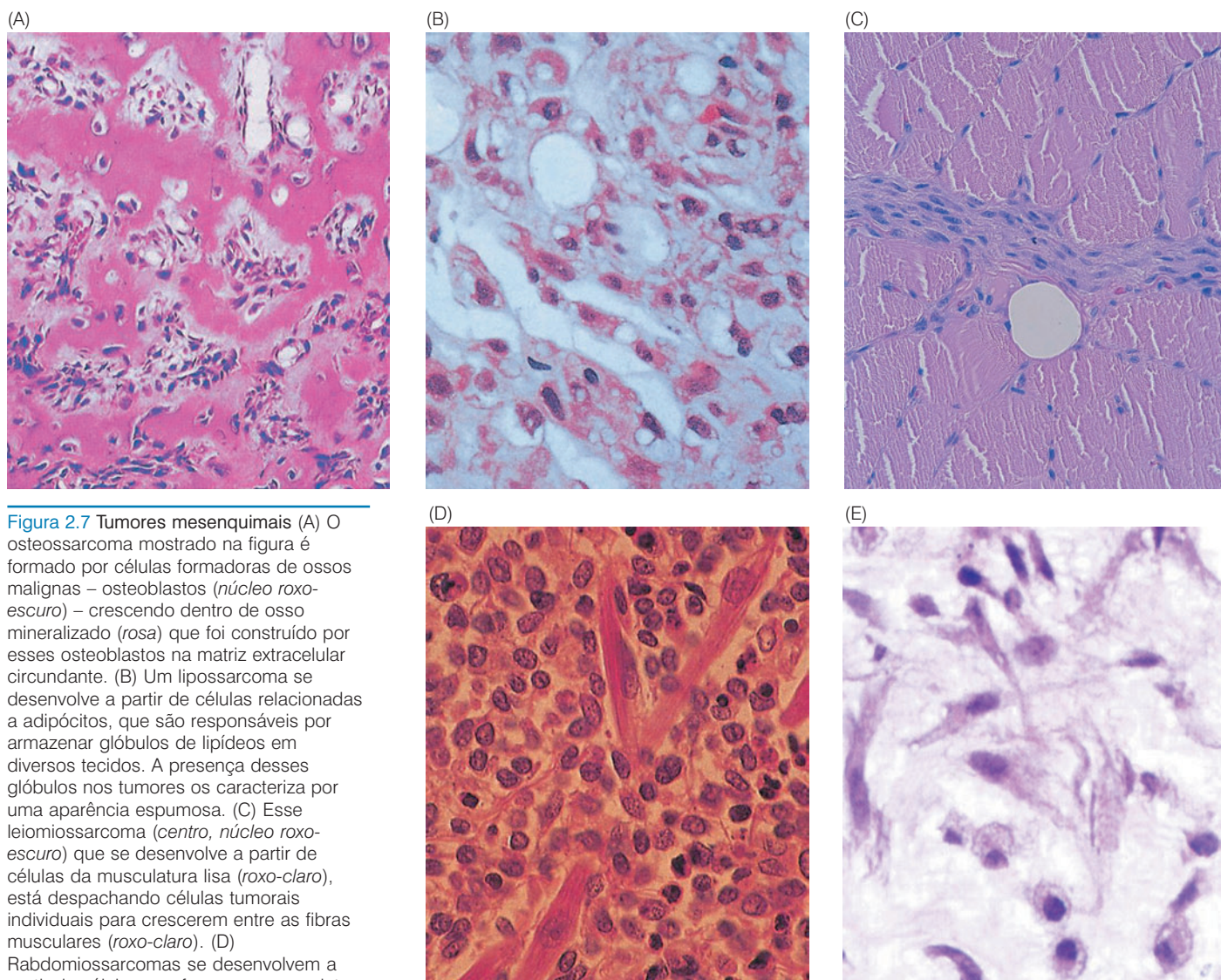


Figura 2.7 Tumores mesenquimais (A) O osteossarcoma mostrado na figura é formado por células formadoras de ossos malignas – osteoblastos (*núcleo roxo-escuro*) – crescendo dentro de osso mineralizado (*rosa*) que foi construído por esses osteoblastos na matriz extracelular circundante. (B) Um lipossarcoma se desenvolve a partir de células relacionadas a adipócitos, que são responsáveis por armazenar glóbulos de lipídeos em diversos tecidos. A presença desses glóbulos nos tumores os caracteriza por uma aparência espumosa. (C) Esse leiomiossarcoma (*centro, núcleo roxo-escuro*) que se desenvolve a partir de células da musculatura lisa (*roxo-claro*), está despachando células tumorais individuais para crescerem entre as fibras musculares (*roxo-claro*). (D) Rabdomyossarcomas se desenvolvem a partir de células que formam a musculatura esquelética estriada; as células cancerosas (*com núcleo vermelho-escuro*) são mostradas em meio de células musculares normais (*vermelho*). (E) Esse tipo de sarcoma em particular nasceu em uma localização anatomicamente não usual – as meninges, que formam a capa protetora do cérebro. (A e D, de A. T Skarin, Atlas of Diagnostic Oncology, 3rd ed. Philadelphia: Elsevier Science Ltd., 2003. E, de Young et al., Wheater's Functional Histology, 4th ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 2003.)

Um segundo grupo de câncer não-epitelial se desenvolve a partir de diversos tipos de células que constituem os tecidos formadores de sangue (**hematopoiético**), incluindo as células do sistema imune (Tabela 2.3 e Figura 2.8). Dentre essas, estão as células destinadas a formar **eritrócitos** (células vermelhas do sangue), células secretoras de anticorpos (**plasma**), assim como células de **linfócitos** T e B. O termo **leucemia** (literalmente “sangue branco”) refere-se a derivados malignos de diversas linhagens de células hematopoiéticas que transitam livremente pela circulação; diferentemente das células vermelhas do sangue, elas não possuem coloração. Os **linfomas** incluem tumores das linhagens **linfóides** (linfócitos B e T) que se agregam para formar massas tumorais sólidas, mais frequentemente encontrados nos nódulos linfáticos, em vez das colônias de células individuais dispersas observadas em leucemias.

O terceiro e último dos maiores grupos de tumores não-epiteliais se desenvolve a partir de células que formam diversos componentes do sistema nervoso central e periférico (Tabela 2.4). Esses são comumente chamados de tumores **neuroectodermis** por sua origem ser na camada celular externa do embrião recém-formado. Nesse grupo, encontram-se os **gliomas**, os **glioblastomas**, os **neuroblastomas**, os **schwanomas** e os **meduloblastomas** (Figura 2.9). Mesmo compreendendo 1,3% de todos os cânceres diagnosticados, eles são responsáveis por aproximadamente 2,5% dos óbitos relacionados ao câncer.

Tabela 2.3 Alguns tipos de malignidades hematopoiéticas mais comuns

leucemia linfocítica aguda
 leucemia mielogenosa aguda
 leucemia mielogenosa crônica
 leucemia linfocítica crônica
 mieloma múltiplo
 linfoma não-Hodgkins^a
 doença de Hodgkins

^a Os tipos de linfomas não-Hodgkins, também conhecidos como linfomas linfocíticos, podem ser colocados em 15 a 20 subcategorias distintas, dependendo da classificação do sistema.

Figura 2.8 Malignidades hematopoiéticas

Malignidades hematopoiéticas tomam diversas formas. (A) Leucemias linfocíticas agudas (ALLs) surgem tanto de células B (80%) como de linhagens de células T (20%) de linfócitos (veja a Seção 15.1). As células que formam este tumor em particular exibem marcadores antigênicos indicando a origem de células pré-B. (B) Como em muitas malignidades hematopoiéticas, essas células de leucemia mielogenosa aguda (AML) possuem somente uma pequena margem de citoplasma ao redor de seu núcleo grande. Elas derivam de uma linhagem de células precursoras que formam diversos tipos de granulócitos, assim como monócitos, estes últimos se desenvolvendo em macrófagos. (C) Os eritroblastos nessa leucemia eritroblástica se parecem com precursores de células vermelhas do sangue diferenciadas – os eritrócitos. (D) Na leucemia mielogenosa crônica (CML), uma variedade de células leucêmicas ostensivamente diferenciadas da linhagem mielóide (medula) são aparentes, sugerindo a diferenciação de células-tronco mielóides em diversos tipos celulares distintos. (E) Mieloma múltiplo (MM) é uma malignidade da linhagem de células B do plasma que são responsáveis por produzir e secretar moléculas de anticorpos, por isso, seus citoplasmas relativamente grandes. São mostradas as células plasmáticas de MM em diferentes estágios de diferenciação (*núcleo roxo*). Em todas essas micrografias, pode-se observar diversos eritrócitos sutilmente corados ao fundo (*células sanguíneas vermelhas*). A. T Skarin, Atlas of Diagnostic Oncology, 3rd ed. Philadelphia: Elsevier Science Ltd., 2003.

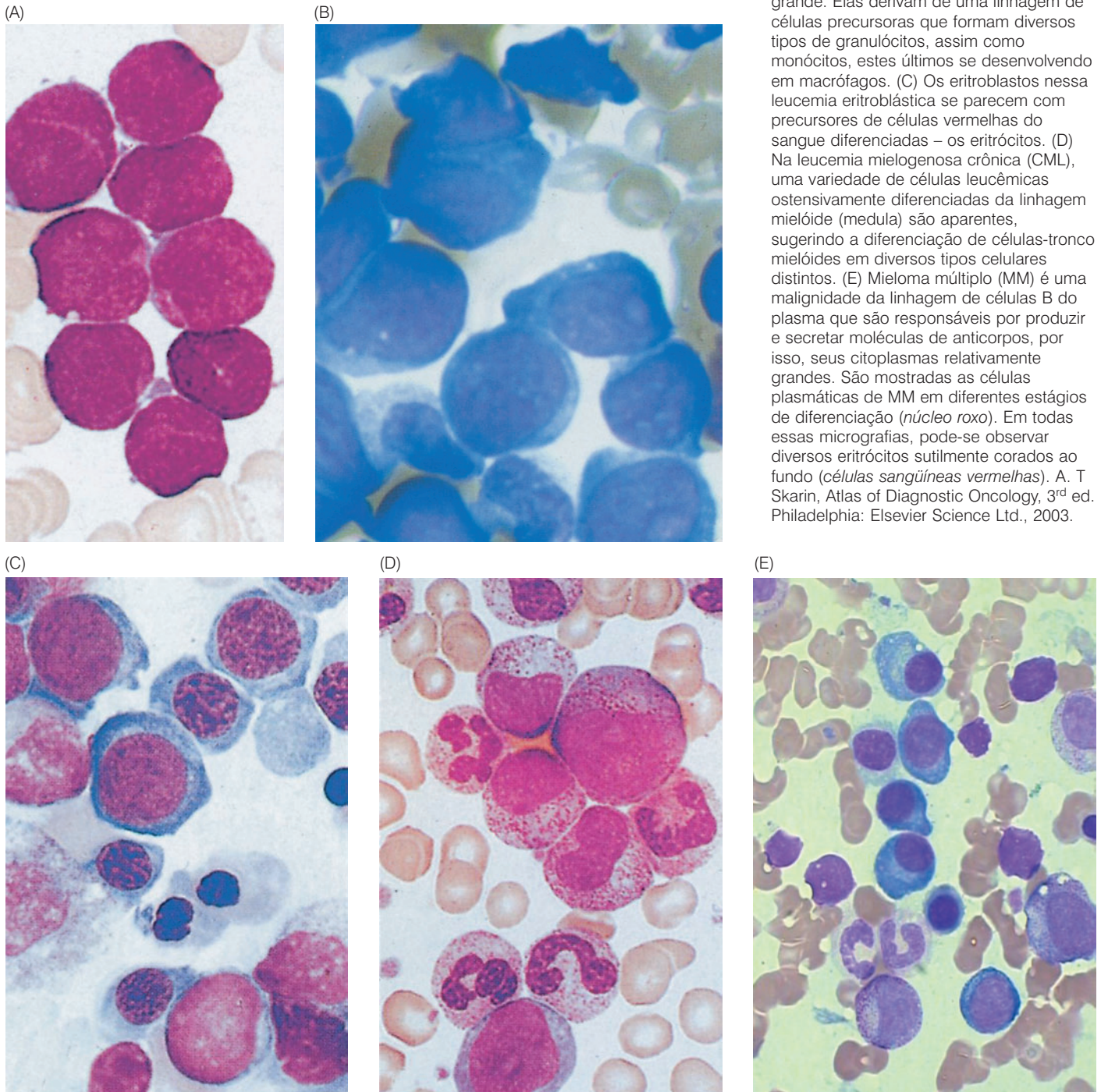


Tabela 2.4 Alguns tipos de malignidades neuroectodermais

glioblastoma multiforme
astrocitoma
meningioma
neurinoma
retinoblastoma
neuroblastoma
ependimoma
oligodendroglioma
meduloblastoma

2.3 Alguns tipos de tumores não se encaixam nas principais classificações

Nem todos os tumores se encaixam perfeitamente em um dos quatro grandes grupos citados. Por exemplo, os **melanomas** são derivados de melanócitos, células pigmentadas da pele e da retina. No entanto, os melanócitos se desenvolvem a partir de estruturas primitivas embrionárias denominadas **cristas neurais**. Mesmo tendo sua origem embrionária próxima àquelas das células neuroectodermas, os melanócitos acabam desviando-se durante o desenvolvimento, estabelecendo-se na pele e no olho, provendo pigmentação a esses tecidos e adquirindo conexões não diretas com o sistema nervoso (Figura 2.10).

Carcinomas pulmonares de células pequenas (SCLCs) possuem características de células **neurosecreatórias**, como as de origem da crista neural nas glândulas **adrenais** localizadas logo acima dos rins. Tais células, quando em resposta a sinalização neuronal, secretam peptídeos biologicamente ativos. Não permanece claro se as SCLCs, que se observam em usuários de tabaco, se desenvolveram a partir das células neuroectodermas durante o desenvolvimento normal na formação do pulmão. De acordo com uma alternativa mais provável, esses tumores se originaram em populações de células endodermas pulmonares que contribuíram com algumas das suas características epiteliais e empregaram aquelas de uma linhagem neuroectodermal.

Essa troca de linhagem tecidual que resulta na aquisição de um novo grupo de características diferenciadas é freqüentemente chamada de **transdiferenciação**. O termo implica que os comprometimentos que as células fizeram durante a embriogênese para entrar em um ou outro tecido e linhagem celular não são irreversíveis, e que, sob certas condições, as células podem se mover de uma linhagem de diferenciação para outra. Tal alteração em nível de fenótipo pode alterar tanto células normais como cancerosas. Por exemplo, na delimitação de muitos carcinomas, células cancerosas epiteliais normalmente sofrem alterações em sua forma e nos programas de expressão gênica, assumindo características das células estromais de origem mesenquimal que se encontram próximas. Essa brusca mudança no fenótipo da célula, chamada de **transição epitelial-mesenquimal** ou simplesmente EMT, caracteriza grande plasticidade por parte das células que normalmente são comprometidas a se comportar como células epiteliais. De acordo com o que está descrito a seguir (Capítulos 13 e 14), essa transição pode freqüentemente acompanhar e permitir a invasão de células de carcinoma a tecidos adjacentes normais.

Mesmo aceitando tais exceções ocasionais, um princípio biológico majoritário parece governar a vasta maioria dos cânceres. Enquanto as células cancerosas desviam substancialmente em comportamento das suas precursoras celulares normais, elas quase sempre retêm alguns dos atributos distintivos dos tipos normais de células das quais elas originaram. Esses atributos fornecem indícios sobre a origem de muitos tumores e permitem que patologistas, ao realizar uma biópsia sob o microscópio, possam afirmar qual o tecido de origem e qual a classificação do tumor, mesmo sem saber o local anatômico de onde a biópsia foi retirada.

Em uma pequena minoria dos casos (1 a 2%), tumores submetidos à análise virtualmente perderam todas as características tecido-específicas diferenciadas dos seus tecidos precursores normais. As células em tais tumores são ditas terem se **diferenciado**, e os tumores como um todo são **anaplásticos**, uma vez que não é mais possível utilizar critérios histopatológicos para identificar os tecidos dos quais eles tiveram origem (Figura 2.11).

2.4 Os cânceres parecem se desenvolver progressivamente

Entre os dois extremos, da arquitetura do tecido normal e do tecido altamente maligno, encontra-se um amplo espectro de tecidos com aparência intermediária. Diferentes graus de anormalidade podem perfeitamente refletir populações celulares que estão se desenvolvendo progressivamente para longe do seu normal em direção a altos graus de agressividade e com-

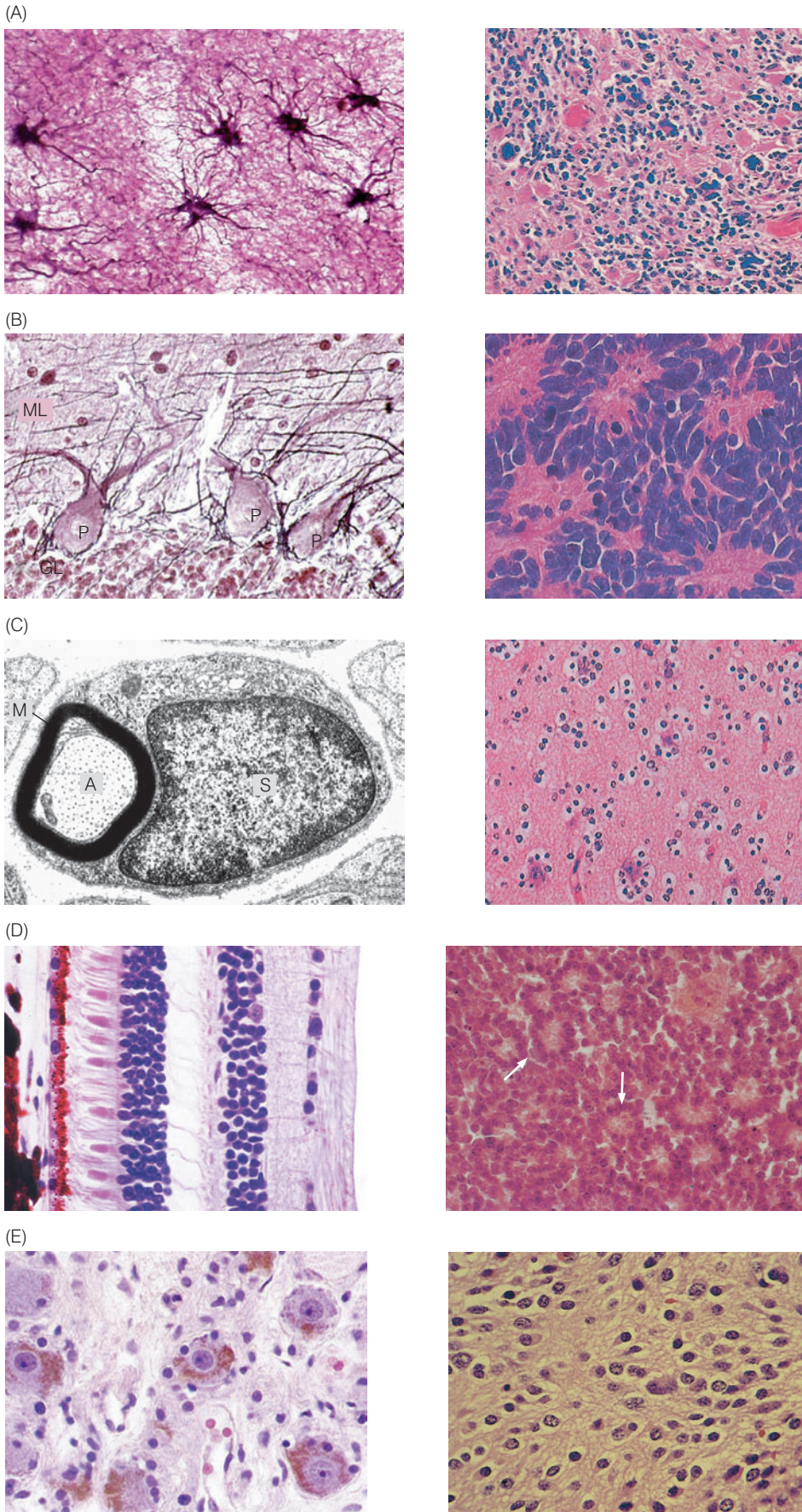


Figura 2.9 Tumores neuroectodermiais

Diversos compostos celulares do sistema nervoso central e periférico podem tornar-se malignos. (A) Astrócitos – não-neuronais, suportam células do cérebro (roxo escuro, *painel da esquerda*) – são os prováveis precursores dos astrocitomas e glioblastomas (*painel direito*). O glioblastoma multiforme recebe este nome em função dos diferentes tipos de células neuroectodermiais que constituem o tumor. As células tumorais apresentam núcleo de diversos tamanhos (roxo). (B) Células das camadas granulares (GL) do cerebelo (*painel esquerdo*) residem abaixo das células de Purkinje (P) e das células da camada molecular (ML) no córtex do cerebelo. Os precursores das células granulares geram meduloblastomas (*painel direito*), que são células conhecidas por sua habilidade de se diferenciar em neurônios, célula da glia e células neuroepiteliais pigmentadas (*núcleo roxo, citoplasma rosa*). Cerca de um terço desses tumores apresentam células em estrutura de roseta que está mostrada aqui. (C) As células de Schwann (S, *painel esquerdo*), mostradas na micrografia eletrônica, normalmente envolvem múltiplas camadas de membrana (M) ao redor dos axônios (A) que promoverão estes últimos com um revestimento que ajuda na condução. Na figura, precursores de oligodendrogliomas (*painel direito*). Cada um dos núcleos das células neoplásicas mostradas aqui possui um halo ao seu redor, que caracteriza esse tumor. (D) Bastonetes, cones e outros tipos de células neuronais (*painel esquerdo*) constituem componentes importantes da retina normal. Retinoblastomas (*painel direito*) se desenvolvem a partir de células que são precursores comuns das células que formam a retina normal. Retinoblastomas frequentemente apresentam característica de roseta, indicada com *flechas*. (E) Células da gânglia simpática do sistema nervoso periférico (*células maiores, painel esquerdo*) geram os neuroblastomas (*painel direito*), normalmente observados em crianças. Aqui as células tumorais individuais estão envoltas por uma densa rede fibrilar, derivada de neurites – processos citoplasmáticos utilizados pelos neurônios para se comunicarem. (De A a E, nos painéis da esquerda, de B. Young et al., *Wheater's Functional Histology*, 4th ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 2003; de A a E, nos painéis da direita, de A. T Skarin, *Atlas of Diagnostic Oncology*, 3rd ed. Philadelphia: Elsevier Science Ltd., 2003.)

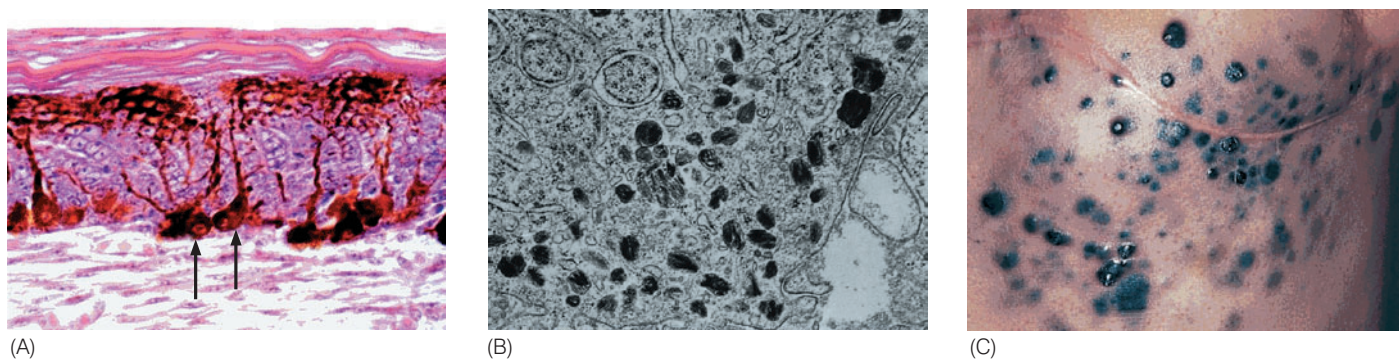


Figura 2.10 Melanócitos e Melanomas (A) Melanócitos (*flechas*), que formam os grânulos de pigmento, estão normalmente dispersos entre os queratinócitos basais da pele (veja também a Figura 2.6A). Eles se prolongam através de processos citoplasmáticos finos pelos quais eles depositam os grânulos no citoplasma dos queratinócitos, que formam a massa do epitélio. Camadas de queratinócitos mortos na superfície da pele (*acima*) e células estromais (*abaixo*) também são aparentes. (B) Os grânulos de pigmentos, mostrados por microscopia eletrônica, tornaram melanomas objetos favoritos de estudo, em função das metástases,

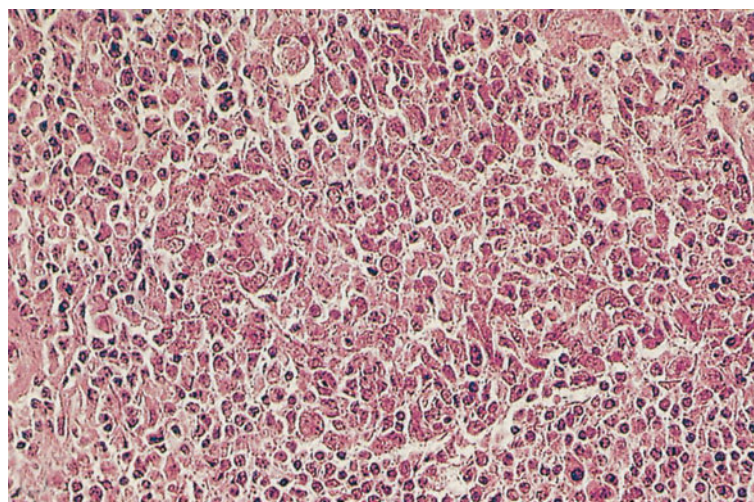
rapidamente detectadas pelos microscópios eletrônicos (p.ex., veja a Figura 2.2A). Uma vez que os melanomas começam a invadir verticalmente as camadas superficiais da pele, chegando até o estroma, possuem uma alta tendência a causar metástases em tecidos distantes. (C) Esse caso de melanoma cutâneo mostra a natureza metastática da doença pelo rápido surgimento das metástases pigmentadas. (A, de W.J. Bacha Jr. et al., *Color Atlas of Veterinary Histology*, 2nd ed. Philadelphia: Lippincott, Williams and Wilkins, 2000; B e C, de A. T Skarin, *Atlas of Diagnostic Oncology*, 3rd ed. Philadelphia: Elsevier Science Ltd., 2003.)

portamento invasivo. Dessa forma, cada tipo de crescimento pode representar um passo distinto ao longo desse caminho evolutivo. Se for assim, tais arquiteturas sugerem, mas não comprovam, que o desenvolvimento de tumores é um processo complexo e composto por diversos passos, um assunto discutido em maiores detalhes no Capítulo 11.

Alguns crescimentos possuem células que se diferenciam minimamente daquelas do tecido normal, mas podem, todavia, ser anormais quando encontradas com um *número* massivo de células. Tais tumores são chamados **hiperplásticos** (Figura 2.12). Apesar de sua proliferação aparentemente desregulada, as células que formam crescimentos hiperplásticos mantiveram a habilidade de se agregarem em tecidos com aparência razoavelmente normal.

Igualmente, uma mínima diferença do tecido normal é observada na **metaplasia**, em que um tipo de camada de células normais é substituído por células de um outro tipo, que em geral não são encontradas nesse local do tecido. Tais invasoras, mesmo que presentes em local errôneo, com frequência parecem completamente normais ao microscópio. A metaplasia é mais freqüente em zonas de transição epitelial, nas quais um tipo de epitélio encontra o outro. Zonas de transição como essas são encontradas na junção do cérvix com o útero e na junção do esôfago com o

Figura 2.11 Tumores anaplásticos de origem desconhecida A aparência histológica de um tumor anaplástico, como mostrado aqui, fornece pouca indicação de seu tecido de origem. Tentativas para determinar a origem dessas células com anticorpo que reconhece especificamente uma ou outra proteína marcadora tecido-específica também podem não comprovar nada. (De A. T Skarin, *Atlas of Diagnostic Oncology*, 3rd ed. Philadelphia: Elsevier Science Ltd., 2003.)



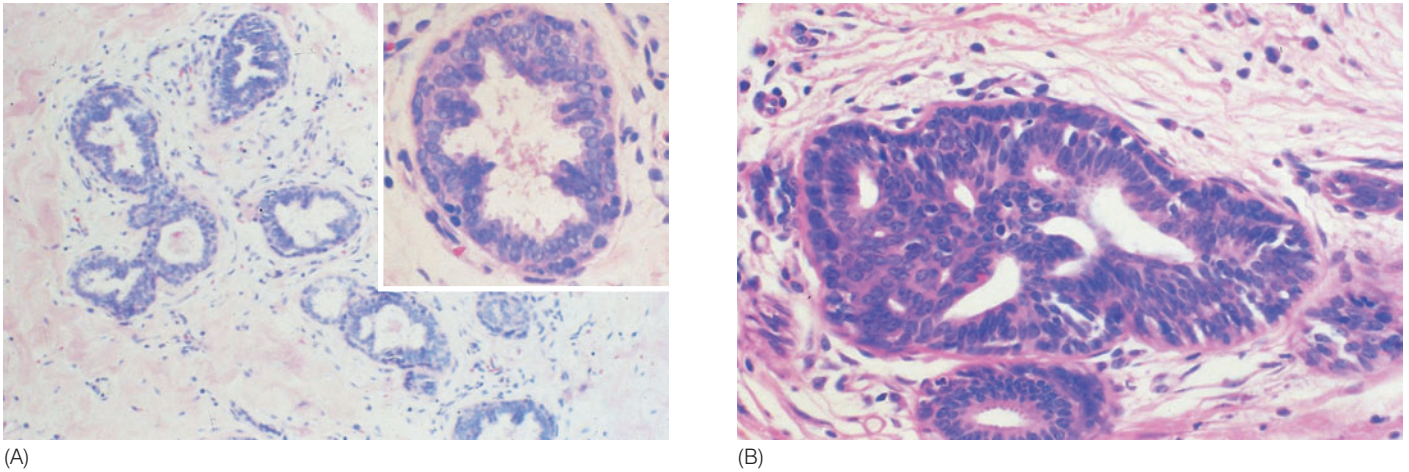


Figura 2.12 Epitélio normal versus epitélio hiperplástico A morfologia do epitélio normal de um ducto de glândula mamária (veja a Figura 2.1B) pode ser comparada com diferentes graus de hiperplasia. (A) Nesses ductos lácteos levemente hiperplásticos, mostrados em baixa magnitude e alta magnitude (*canto direito*), células epiteliais mamárias começaram a se empilhar e se sobressair para dentro da lúmina. (B) Um ducto mamário com hiperplasia mais avançada mostra as células epiteliais amontoadas quase preenchendo o lúmen. Entretanto, elas não penetraram a membrana basal (*não-visível*) e não invadiram o estroma que as cerca. (De A. T Skarin, Atlas of Diagnostic Oncology, 3rd ed. Philadelphia: Elsevier Science Ltd., 2003).

estômago. Em ambas as localizações, o epitélio escamoso normalmente sofre uma bruta transição para epitélio muco-secretor. Por exemplo, um indicativo precoce de alteração pré-maligna no esôfago é uma condição metaplástica chamada de **esôfago de Barrett**, na qual o epitélio escamoso que em geral está presente é substituído por células epiteliais secretoras de um tipo de célula normalmente encontrado no interior do estômago (Figura 2.13). Mesmo que essas células gástricas tenham uma aparência bastante normal, essas metaplasias são consideradas uma etapa inicial no desenvolvimento de carcinomas de esôfago. De fato, pacientes que sofrem do esôfago de Barrett têm um risco trinta vezes maior de desenvolver esses tumores altamente malignos.

Um tecido levemente mais anormal é dito **displásico**. Células dentro de uma displasia em geral são **citologicamente** anormais, ou seja, a aparência individual de cada célula não é mais normal. As mudanças citológicas incluem variabilidade no tamanho e forma do núcleo, aumento de coloração dos núcleos por corantes, aumento da relação do tamanho do núcleo com o tamanho citoplasmático, aumento da atividade mitótica e perda de características citoplasmáticas relacionadas com as células diferenciadas normais do tecido (Figura 2.14). Em crescimentos displásicos, os números relativos dos diversos tipos celulares vistos no tecido normal não são mais observados. Juntas, essas alterações nas células individuais e no número de células possuem grandes efeitos na arquitetura geral do tecido. Displasia é considerada um estado transitório entre crescimentos completamente benignos e aqueles que são pré-malignos.

Ainda mais anormais são os crescimentos observados nos tecidos epiteliais, variavelmente chamados de adenomas, **pólipos**, pólipos adenomatosos, **papilomas** e, no caso de pele, verrugas (Figura 2.15). Esses são freqüentemente grandes crescimentos facilmente observados a

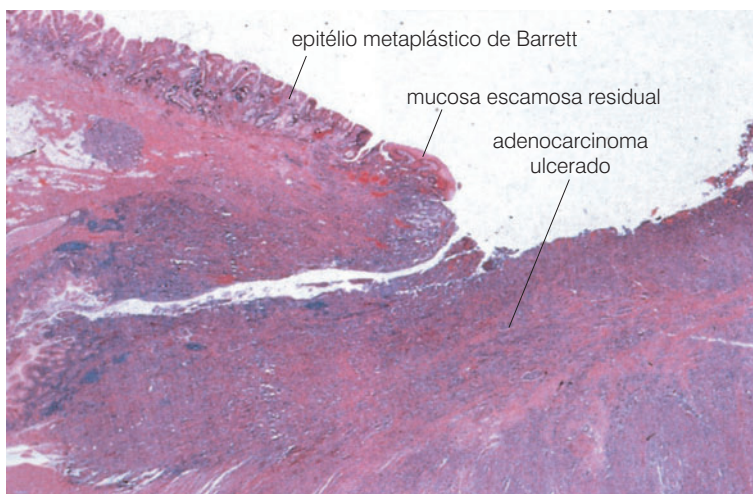


Figura 2.13 Conversão metaplástica do epitélio Em algumas condições de pré-câncer, o epitélio normalmente presente é substituído pelo epitélio de um tecido adjacente – processo de metaplasia. Por exemplo, no esôfago de Barrett (ou esofagite de Barrett), as células escamosas que em geral se encontram na parede do esôfago (*mucosa escamosa residual*) são substituídas pelas células secretoras que migram do estômago (epitélio metaplástico de Barrett). Essa metaplasia em questão, causada por refluxo crônico de ácido do estômago, pode ser uma lesão precursora para um carcinoma de esôfago, que aqui se originou de células gástricas (adenocarcinoma ulcerado). (Adaptada de A. T Skarin, Atlas of Diagnostic Oncology, 3rd ed. Philadelphia: Elsevier Science Ltd., 2003.)

Figura 2.14 Formação de epitélio displásico Nessa neoplasia intra-epitelial escamosa de alto grau da cérvix, as células epiteliais não atravessaram a membrana basal (*não-visível*) e não invadiram o estroma localizado logo abaixo. De qualquer forma, somente a camada superior de células mantém a aparência achatada das células escamosas, enquanto as camadas celulares inferiores (*roxo*) perderam sua característica de célula achatada (veja a Figura 2.6A), sutilmente aumentaram o tamanho de seus núcleos e se acumularam em camadas celulares extra. (De A. T Skarin, *Atlas of Diagnostic Oncology*, 3rd ed. Philadelphia: Elsevier Science Ltd., 2003.)

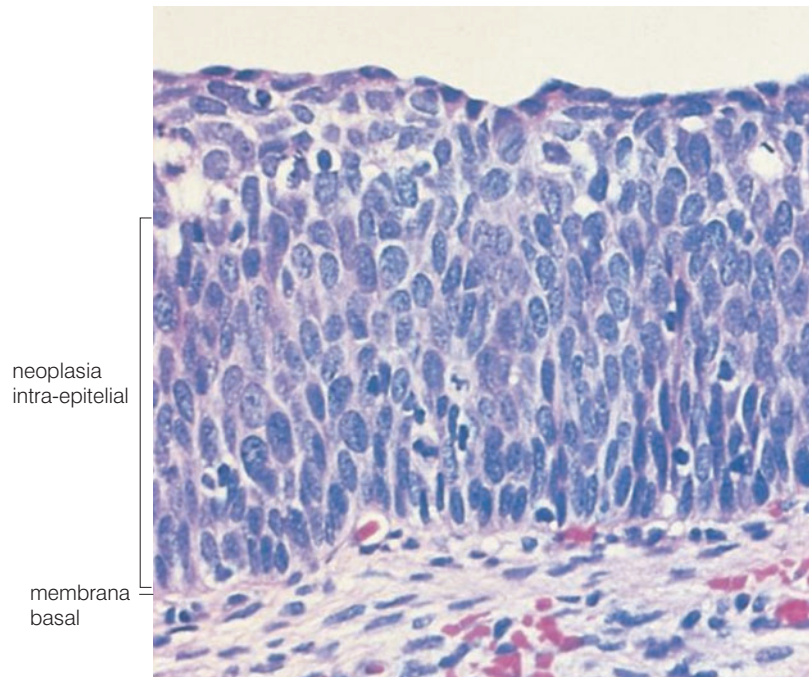
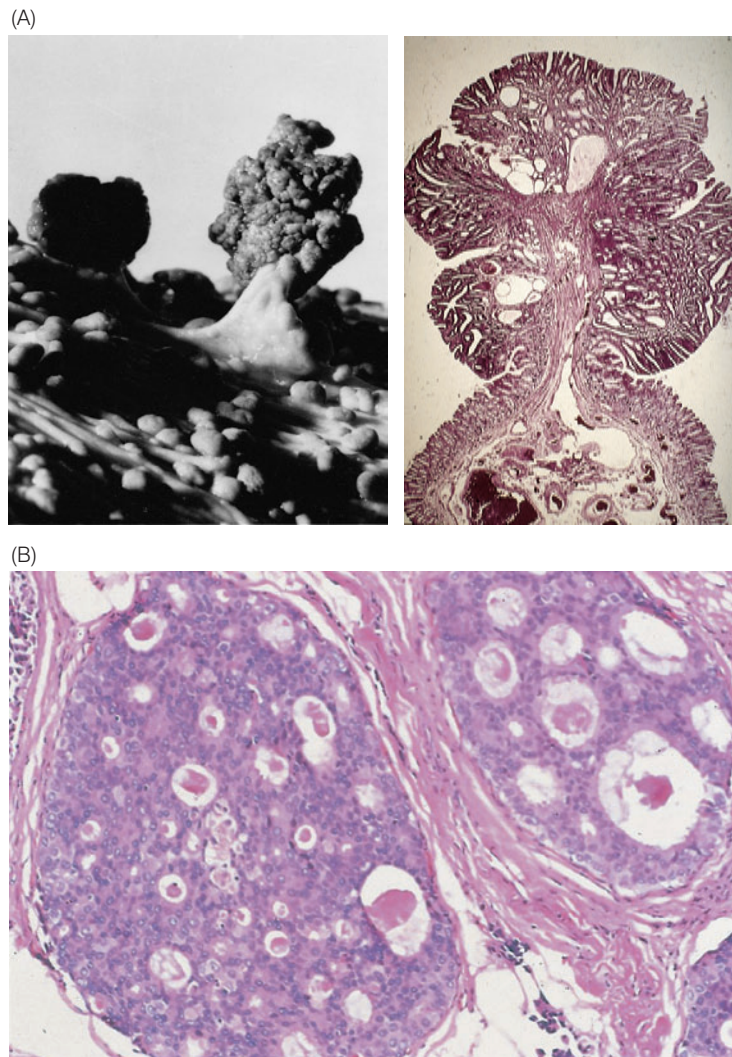
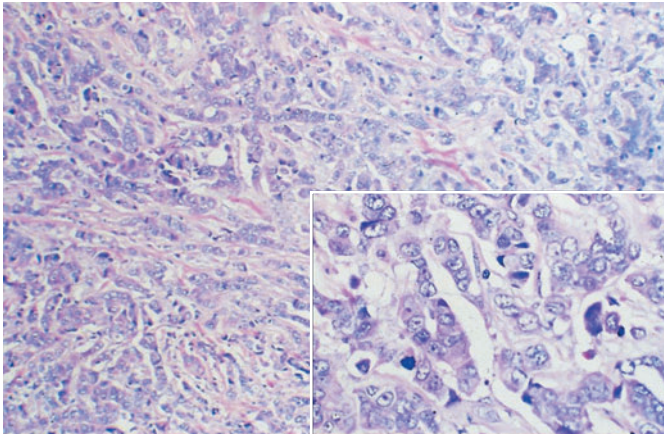
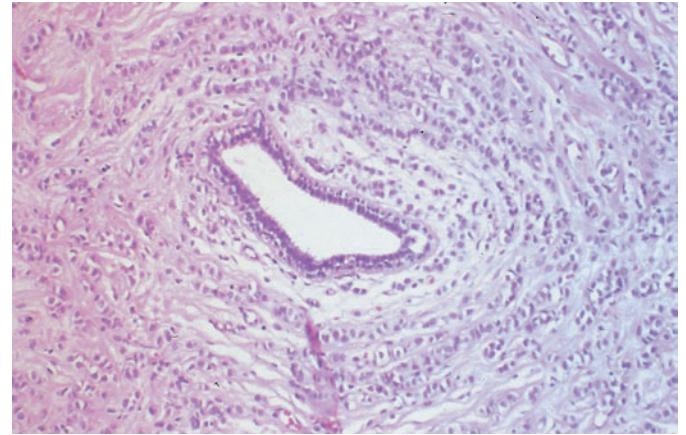


Figura 2.15 Adenomas pré-invasivos e carcinomas Crescimentos adenomatosos, chamados de pólipos em alguns órgãos, possuem uma morfologia que os tornam claramente distintos do epitélio normal e do displásico. (A) No cólon, crescimentos pré-invasivos apresentam-se tanto como engrossamento achatado da parede do cólon (pólipos sésseis, *não-mostrados*) ou como crescimento em forma de haste (pólipos pedunculados), como mostrado aqui. Tais crescimentos, também chamados de "adenomas", não penetraram a membrana basal e não invadiram o estroma localizado logo abaixo. Pólipos são mostrados aqui em uma foto (*esquerda*) e uma secção micrográfica (*direita*). (B) Nesse carcinoma interno de ducto de mama, células epiteliais cancerosas quase preencheram completamente os dois ductos (*esquerda, direita*) e os expandiram a um tamanho maior, mas ainda não atravessaram a membrana basal circundante nem invadiram o estroma. (A, *esquerda*, cortesia de John Northover and Câncer Research, UK; *direita*, cortesia de Anne Campbell; B, de A. T Skarin, *Atlas of Diagnostic Oncology*, 3rd ed. Philadelphia: Elsevier Science Ltd., 2003.)





(A)



(B)

olho nu. Eles possuem todos os tipos de células encontrados no tecido epitelial normal, porém essa massa de células deu início a um programa de expansão substancial, criando uma massa macroscópica. Sob o microscópio, o tecido dentro desses crescimentos adenomatosos é visto como displásico. Eles normalmente crescem até um certo tamanho e depois param, respeitando o limite criado pela membrana basal, que continua os separando do epitélio localizado logo abaixo. Como os crescimentos adenomatosos não penetram a membrana basal e não invadem o tecido subjacente, eles são considerados benignos.

Um grau mais avançado de anormalidade é representado por crescimentos que invadem os tecidos subjacentes (Figura 2.16). Pela primeira vez nos deparamos com tumores malignos que possuem alto potencial de ameaçar a vida do indivíduo que o possui. Oncologistas clínicos e cirurgiões freqüentemente reservam a palavra “câncer” para esses e outros crescimentos ainda mais anormais. De qualquer forma, neste livro, assim como na maioria das pesquisas contemporâneas sobre câncer, essa denominação é utilizada mais imprecisamente para referir-se a todos os tipos de crescimentos anormais. (Nesse caso de tecido epitelial, o termo “carcinoma” é normalmente aplicado a crescimentos que se desenvolveram a esse nível de invasividade.) Esses crescimentos desiguais – tanto os benignos como os malignos – são coletivamente chamados de **neoplasias**, isto é, novos tipos de tecidos. (Alguns reservam o termo “neoplasia” para tumores malignos.)

Como mencionado anteriormente, células de um tumor primário recém-formado podem semear novas colônias de tumores em locais distantes no organismo por meio do processo de metástase. Esse processo, por si só, é extraordinariamente complexo, e depende da habilidade das células cancerosas de invadirem tecidos adjacentes, entrarem para o sistema sanguíneo e para os vasos linfáticos, migrarem por tais vasos para locais anatomicamente distantes, deixarem os vasos e invadirem o tecido subjacente e encontrarem uma nova colônia de células tumorais em um local distante. Esses passos são o assunto de discussão detalhada no Capítulo 14.

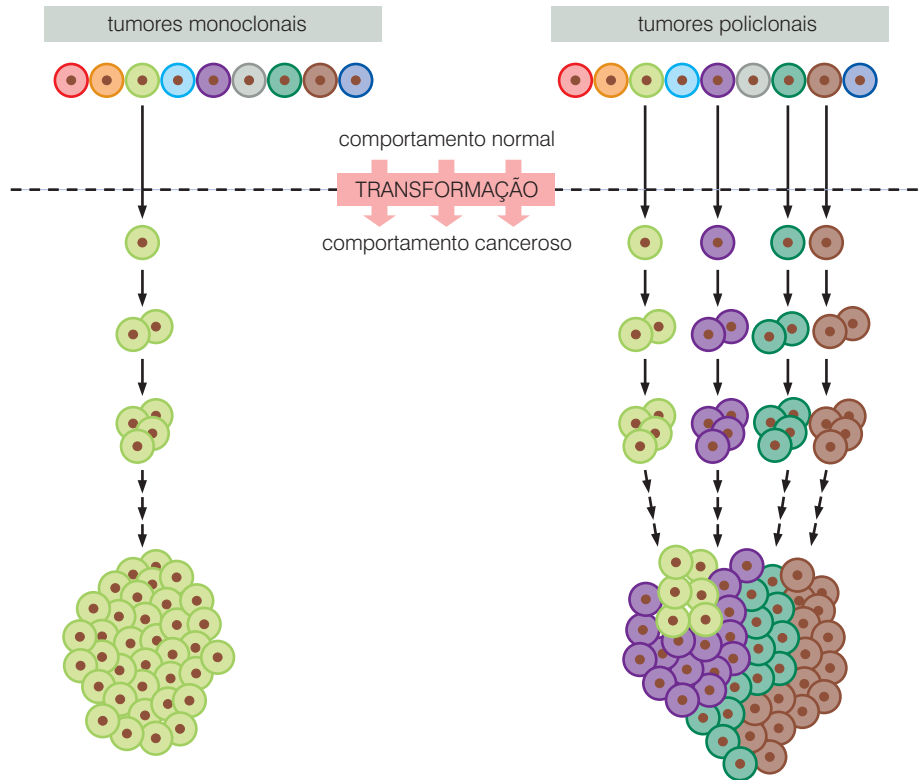
Em função de que vários crescimentos catalogados nesta seção representam um aumento no grau de anormalidade tecidual, é provável que eles possuam diferentes pontos de parada ao longo do caminho da **progressão tumoral**, na qual um tecido normal se desenvolve progressivamente em outro altamente maligno. De qualquer maneira, as relações entre precursor e produto desses diversos crescimentos (i. e., normal → hiperplásico → displásico → neoplásico → metastático) são apenas sugeridas pelas descrições citadas anteriormente, porém não-comprovadas.

2.5 Tumores são crescimentos monoclonais

Mesmo se aceitarmos a idéia de que tumores se desenvolvem a partir da alteração progressiva das células normais, outras questões permanecem obscuras: quantas células normais são an-

Figura 2.16 Carcinomas invasivos Tumores são considerados malignos após terem rompido a membrana basal e invadido o estroma ao redor. (A) Neste carcinoma de ducto invasivo de mama, ilhas de células cancerígenas de epitélio estão misturadas com células do estroma. A natureza ductal deste carcinoma é revelada em maior resolução (*detalhe*), em que se pode observar a formação de ductos rudimentares pelas células de carcinoma (p. ex., *centro do detalhe*) com os lúmens. (B) Neste carcinoma lobular invasivo de mama, células individuais de carcinoma extravasaram para o estroma, geralmente fazendo-o de modo único (*vários núcleos pequenos e roxos*). Eles circundam um único ducto – um carcinoma *in situ* – no qual as células de câncer epiteliais crescem voltadas para o lúmen do ducto, não tendo penetrado a membrana basal e invadido o estroma circundante. (De A. T. Skarin, Atlas of Diagnostic Oncology, 3rd ed. Philadelphia: Elsevier Science Ltd., 2003.)

Figura 2.17 Monoclonalidade *versus* policlonalidade de tumores Na teoria, tumores podem ser de origem tanto monoclonal como policlonal. Em um tumor policlonal (*direita*), múltiplas células atravessam a barreira da normalidade para malignidade para se tornarem precursoras de diversas subpopulações geneticamente distintas de células dentro de uma massa tumoral. Em um tumor monoclonal (*esquerda*), somente uma única célula é transformada de normal para uma com comportamento canceroso para se tornar precursora das células em uma massa tumoral.



tecessoras das que se congregam para formar um tumor (Figura 2.17)? As células tumorais descendem de uma única célula ancestral que ultrapassou o limite do crescimento normal para o anormal? Ou uma grande massa celular sofreu essa alteração, e cada célula se tornou o ancestral de uma subpopulação distinta de células de uma massa tumoral?

A maneira mais efetiva de reportar esse assunto é determinar se todas as células na massa tumoral dividem um único marcador comum genético ou bioquímico. Por exemplo, uma mutação somática aleatória pode marcar uma célula de uma maneira incomum. Se esse marcador genético estivesse presente em todas as células de um tumor, isso sugeriria que todas elas são descendentes de uma célula inicialmente mutada e que todas as demais herdaram o marcador a partir de um único progenitor em comum. Tal população de células que derivam de uma única célula ancestral comum é chamada de **monoclonal**. Alternativamente, se a massa tumoral é composta por uma série de subpopulação de células geneticamente distintas que não fornecem nenhum indicativo de uma origem comum, ela pode ser considerada **policlonal**.

Os primeiros experimentos desenhados para medir a clonabilidade de populações de células tumorais foram baseados em um evento marcante não-genético (**epigenético**) de ocorrência natural. Como descrito anteriormente (Barra lateral 1.2, Figura 1.10), em células somáticas de embriões de jovens fêmeas mamíferas, um dos dois cromossomos X em cada célula é escolhido aleatoriamente para ser silenciado. Esse silenciamento faz com que quase todos os genes em um cromossomo X em uma célula sejam reprimidos transcricionalmente e é manifestado cariotipicamente por meio da condensação do cromossomo X silenciado em uma pequena partícula chamada de corpúsculo de Barr. Uma vez decidida a inativação do cromossomo X (de origem materna ou paterna) na célula embrionária, todas as células descendentes nos tecidos do adulto aparentam respeitar a decisão feita por suas antecessoras no embrião e assim continuam a inativar o mesmo cromossomo X.

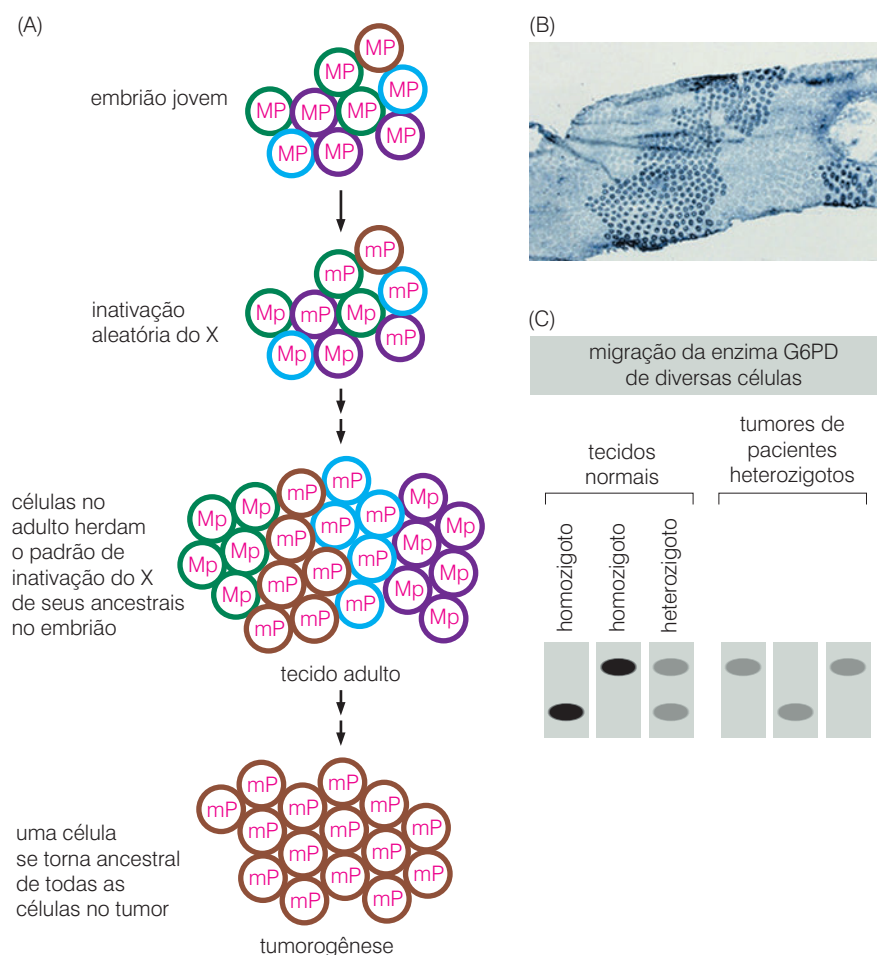
O gene para desidrogenase glicose-6-fosfato (G6PD) está localizado no cromossomo X, e mais de 30% das mulheres afro-americanas apresentam heterozigose para esse loco. Assim, elas carregam dois alelos especificando formas de G6PD que podem ser diferenciadas ou por eletroforese em gel

de amido ou pelo fato de que uma forma é mais resistente a inativação por calor do que a outra. Devido ao silenciamento do cromossomo X, cada uma das células nessas mulheres heterozigotas expressará somente um ou outro alelo do gene *G6PD*, que é manifestado, em contrapartida, na variante da proteína G6PD que essas células sintetizam (Figura 2.18). Na maioria de seus tecidos, metade das células sintetiza uma variante da enzima, enquanto a outra metade sintetiza a outra variante. Em 1965, foram reportadas observações sobre o número de **leiomiomas** (tumor benigno da parede uterina) em afro-americanas heterozigotas. Cada leiomioma invariavelmente expressava tanto uma quanto a outra forma da enzima G6PD. Isso significou que, com grande probabilidade, todas as suas células componentes descendiam de um único progenitor em comum que expressava apenas aquele alelo em particular.

Essa demonstração inicial de monoclonalidade em tumores humanos foi seguida por diversas outras confirmações desse conceito. Uma prova veio da observação de **mielomas**, que derivam dos precursores de células B de células plasmáticas produtoras de anticorpos. Normalmente esse grupo de precursores de célula B consiste em centenas de milhares, provavelmente milhões de subpopulações distintas, cada qual expressando sua própria molécula de anticorpo específica como consequência de rearranjo particular do gene da **imunoglobulina**. Em contraste, todas as células de mieloma em um paciente produzem a molécula de anticorpo idêntica, indicando sua descendência a partir de um único ancestral em comum que esteve presente anos antes nessa complexa população celular heterogênea. (Figura 2.19A)

Talvez a demonstração mais real da monoclonalidade de um tumor tenha vindo de observações de células cancerosas que têm uma variedade de aberrações cromossômicas, as quais podem ser visualizadas microscopicamente quando há a condensação dos cromossomos, durante a metáfase da mitose. Frequentemente, uma anormalidade cromossômica muito peculiar –

Figura 2.18 Padrões de inativação do cromossomo X e a monoclonalidade dos tumores (A) Enquanto um embrião feminino inicia com ambos os cromossomos X, em um estágio igualmente ativo, tanto o cromossomo X herdado pela mãe (M) como o herdado pelo pai (P) logo sofrem inativação aleatória. Tal inativação silencia a expressão de quase todos os genes que residem naquele cromossomo. Em um adulto, todos os descendentes de uma célula embrionária específica continuam a inativar o mesmo cromossomo X. Portanto, o organismo adulto de uma fêmea é formado por clones de células do tipo Mp e do tipo mP, em que a *letra minúscula* denota estado de inativação. (B) As duas formas alélicas da desidrogenase glicose-6-fosfato (G6PD), que é codificada por um gene no cromossomo X, possuem sensibilidades diferenciadas a inativação por calor. Portanto, um sutil aquecimento de um tecido de um heterozigoto – neste caso uma secção do intestino – revela clones de células que carregam a variante da enzima (*pontos azul-escuro*) resistente ao calor, ainda ativa, entre os clones que não a carregam. As células em cada clone são descendentes de uma célula embrionária que durante a embriogênese decidiu inativar seu cromossomo X paternal ou maternal. (C) O uso de eletroforese em gel de amido para resolver as duas formas de G6PD mostrou que todas as células cancerosas em um tumor desenvolvido em um paciente heterozigoto para G6PD expressam tanto uma quanto a outra forma desta enzima. Isso indica que todas as células descendem de um ancestral comum, o qual já exibia esse padrão específico de inativação de X. Tal descoberta sugeriu que as células cancerosas de uma massa tumoral constituem um crescimento monoclonal. (B, de M. Novelli et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 3311-3314, 2003; C, adaptada de P.J. Fialkow, *N. Engl. J. Med.* 291: 26-35, 1974.)



resultado claro de um acidente genético raro – é observada em células cancerosas que compõem uma massa tumoral (Figura 2.19B). Tal observação torna óbvio que todas as células malignas desse tumor descendem de uma única célula ancestral, na qual ocorreu a reestruturação originalmente.

Enquanto tais observações parecem fornecer provas de que uma população tumoral é monoclonal, a tumorigênese pode ser mais complexa. Vamos imaginar, de uma maneira geral, que dez células normais em um tecido simultaneamente atravessaram a barreira da normalidade para se tornarem malignas (ou pelo menos pré-malignas) e que cada uma dessas células, e, por consequência, seus descendentes, passaram a se proliferar incontrolavelmente (veja a Figura 2.17). Cada uma dessas dez células iniciais semearia uma ampla população monoclonal, e a massa tumoral como um todo, que consistiria na mistura das populações dessas dez células, seria policlonal.

É provável que cada uma dessas dez populações de clones se diversifique sutilmente das outras nove em algumas características, dentre elas o tempo necessário para essa população de células se duplicar. A simples matemática indica que populações de células que exibem um tempo de geração um pouco menor irão, mais cedo ou mais tarde, crescer mais rápido do que as demais, e que os descendentes dessas células serão dominantes na massa tumoral, criando o que vai parecer ser um tumor monoclonal. De fato, diversos tumores parecem necessitar de décadas para se desenvolverem, o que é tempo suficiente para uma subpopulação clonal se tornar dominante na massa tumoral. Portanto, a monoclonalidade dessas células em um tumor grande dificilmente prova que ele era estritamente monoclonal durante os estágios iniciais de seu desenvolvimento.

Um segundo fator confundível deriva da instabilidade genotípica e fenotípica de uma população de células tumorais. Como será discutido em maiores detalhes no Capítulo 11, a população de células em um tumor pode iniciar como uma coleção relativamente homogênea de

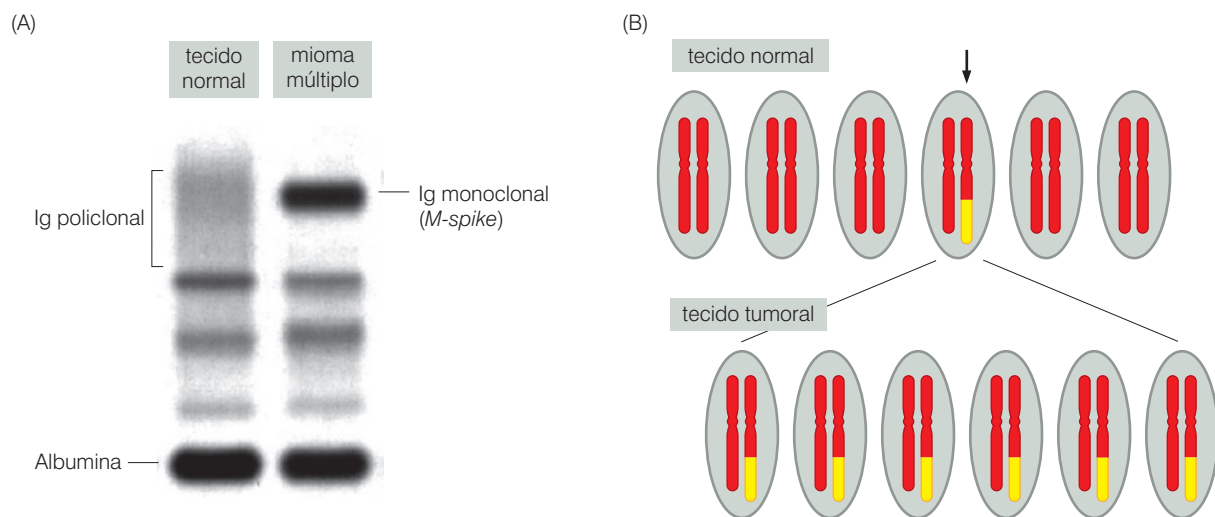


Figura 2.19 Provas adicionais da monoclonalidade de um tumor (A) No plasma normal, moléculas de imunoglobulina (Ig) (i. e., anticorpos) migram como uma coleção de moléculas heterogêneas na eletroforese em gel (Ig policlonal, *parte superior da canaleta esquerda*); essa heterogeneidade é indicativa da participação de um amplo espectro (uma população policlonal) de células plasmáticas na produção de anticorpos. De qualquer forma, na doença do mieloma múltiplo, essa população de moléculas heterogêneas de Ig é substituída por uma única espécie de anticorpo (chamado de *M-spike*), o qual é produzido por uma única população clonal de células tumorais secretoras de anticorpo. (B) Ilustrado aqui está uma translocação não-comum (*seta*)

que envolve a troca de segmentos entre dois cromossomos separados (não-homólogos) – cromossomos *vermelhos* e *amarelos*; a translocação afeta somente um dos cromossomos homólogos pareados. Esse evento de translocação ocorre entre a população de células cariotipicamente normais (*fileira superior*), cria uma “assinatura” característica do tumor que está sendo estudado em particular. (Somente um dos dois produtos da translocação está mostrado aqui.) Como todas as células cancerosas de um dado tumor carregam igualmente a rara translocação (*linha inferior*), isso indica que eles descendem de um progenitor único no qual inicialmente ocorreu essa translocação. (A, cortesia de S. Chen – Kiang and S. Ely.)

células (assim formando um crescimento monoclonal), porém logo essa população pode tornar-se bastante heterogênea, em função da aquisição contínua de novos alelos mutantes por diferentes células nessa população. A heterogeneidade genética resultante pode mascarar a verdadeira origem monoclonal dessa população de células, uma vez que muitos dos marcadores genéticos nessas células descendentes estarão presentes apenas nas subpopulações específicas de células dentro da massa tumoral.

Essas alterações complicam nosso entendimento sobre as origens monoclonais dos tumores. Apesar de tudo, há um consenso amplamente distribuído de que a grande maioria dos tumores humanos são crescimentos monoclonais que descendem de uma única célula progenitora que deu os primeiros pequenos passos para se tornar cancerosa.

2.6 Cânceres ocorrem com vastas frequências diferentes em populações humanas distintas

A natureza do câncer sugere que ela seja a doença do caos, o colapso da ordem biológica existente no corpo humano. Mais especificamente, a desordem observada no câncer deriva-se diretamente do mau funcionamento do controle que normalmente é responsável por determinar quando e onde as células ao longo do corpo irão multiplicar-se. Na realidade, existe uma ampla oportunidade na desordem do câncer para atacar o corpo humano. A maior parte das mais de 10^{13} células no organismo continua a carregar informação genética que antes permitia que elas existissem e pudessem, no futuro, se multiplicar mais uma vez. Isso explica por que o risco de proliferação celular exacerbada em diversos locais ao longo do organismo é substancial ao longo da vida de mamíferos como nós.

Mais precisamente, o risco de se ter câncer é muito maior do que o tamanho de uma população $> 10^{13}$ possa sugerir, uma vez que este número representa a média de uma população de células em estado estacionário em um organismo em qualquer ponto no tempo durante sua vida adulta. O número agregado de células que são formadas durante o tempo de vida médio de um humano é cerca de 10^{16} , um número que comprova a enorme quantidade de geração celular – o que inclui morte e reposição celular (quase 10^7 eventos por segundo) – que ocorre continuamente em diversos tecidos do corpo. Como discutido nos Capítulos 9 e 12, cada vez que uma nova célula é formada pelo complexo processo de crescimento e divisão celular, existem diferentes maneiras desses eventos ocorrerem de maneira incorreta. Desse modo, a probabilidade de ocorrer um desastre, incluindo formação de células cancerosas, é bastante grande.

Como um processo biológico normal (divisão celular incessante) provavelmente cria um substancial risco de câncer, pareceria lógico que populações humanas ao longo do mundo poderiam experimentar frequências similares de câncer. De qualquer forma, quando as taxas de incidência de câncer (i. e., as taxas nas quais as doenças são diagnosticadas) são checadas em diversos países, aprendemos que os riscos de muitos tipos de cânceres variam dramaticamente (Tabela 2.5), ao passo que outros tipos (não-indicados na Tabela 2.5) de fato mostram taxas de incidências comparáveis ao longo do globo. No entanto, nossa especulação de que todos os cânceres deveriam atingir diferentes populações humanas em taxas comparáveis está simplesmente errada. Alguns ocorrem e outros não. Tais fatos nos forçam a reconsiderar o nosso pensamento de como os cânceres são formados.

Alguns dos mais do que 100 tipos de cânceres humanos parecem ter uma alta proporção de tumores que são causados por acidentes da natureza aleatórios e inevitáveis e, dessa forma, ocorrem com frequências comparáveis em várias populações humanas. Isso parece ser verdadeiro para alguns tipos de tumores pediátricos. Em adição a essas taxas de incidência relativamente constantes de alguns cânceres específicos, ainda outros fatores parecem intervir em certas populações para aumentar dramaticamente o número total de casos de câncer. Os dois fatores contribuintes óbvios aqui são hereditariedade e ambiente. Diferentes populações humanas podem carregar alelos suscetíveis ao câncer em frequências bastante diferentes. De maneira alternativa, o meio ambiente onde esses indivíduos vivem pode contribuir fortemente para as

Tabela 2.5 Variação geográfica da incidência de câncer e taxas de mortalidade

Países que mostram as incidências mais altas e mais baixas de tipos específicos de câncer ^a			
Local do câncer	País de maior risco	País de menor risco	Risco relativo H/L ^b
Pele (melanoma)	Austrália (Queensland)	Japão	155
Lábio	Canadá (Newfoundland)	Japão	151
Nasofaringe	Hong Kong	Reino Unido	100
Próstata	Estados Unidos (Afro-americano)	China	70
Fígado	China (Shangai)	Canadá (Nova Escócia)	49
Pênis	Brasil	Israel (Asquenazes),	42
Cérvix (útero)	Brasil	Israel (não-judeus)	28
Estômago	Japão	Kuwait	22
Pulmão	Estados Unidos (Luisiana, Afro-americano)	Índia (Madras)	19
Pâncreas	Estados Unidos (Los Angeles, Coreano americano)	Índia	11
Ovário	Nova Zelândia (Polinésia)	Kuwait	8

Áreas geográficas que mostram maiores e menores taxas de mortalidade a partir de tipos específicos de câncer ^c			
Local do câncer	Área de maior risco	Área de menor risco	Risco relativo H/L ^b
Pulmão, homem	Leste da Europa	Oeste da África	33
Esôfago	África do Sul	Oeste da África	16
Cólon, homem	Austrália, Nova Zelândia	África Central	15
Mama, mulher	Norte da Europa	China	6

^aVer C. Muir, J. Waterhouse, T. Mack et al., eds., *Cancer Incidence in Five Continents*, vol. 5, Lyon: International Agency for Research on Cancer, 1987; resumido por V.T. DeVita, S. Hellman, and S.A. Rosenberg, *Cancer: Principles and Practice of Oncology*, Philadelphia: Lippincott, 1993.

^bRisco relativo: incidência ajustada pela idade ou pela taxa de mortalidade em áreas ou países maiores (H) dividido pela incidência ajustada pela idade ou pela taxa de mortalidade em países ou áreas menores (L). Esses números se referem às taxas ajustadas pela idade, p.ex., o risco relativo de um indivíduo de 60 anos morrer de um tipo específico de tumor em um país comparado com um indivíduo de 60 anos de outro país.

^cVer P. Pisani, D.M. Parkin, F. Bray and J. Ferlay, *Int. J. Cancer* 83:18-29, 1999. Esta pesquisa dividiu a população humana em 23 áreas geográficas e analisou as taxas de mortalidade relativa de diversos tipos de câncer em cada área.

taxas de incidência da doença. O ambiente, de maneira ampla, inclui tanto o ar quanto a água consumidos pelo organismo, assim como estilo de vida, por exemplo, escolha da dieta, hábitos de reprodução e tabagismo.

Qual dessas duas alternativas – hereditariedade ou ambiente – é o dominante determinante da variação na incidência do câncer entre países? Enquanto diversos tipos de alelos causadores de doenças estão distribuídos de forma desigual nos grupos de genes de diferentes populações humanas, esses alelos não parecem explicar a dramática diferença nas taxas de incidência de vários cânceres pelo mundo. Tal fato é melhor demonstrado por meio da medida de taxas de câncer na população imigrante. Por exemplo, as taxas de câncer de estômago em japoneses são de 6 a 8 vezes superiores às dos americanos (Figura 2.20). Entretanto, quando os japoneses se fixaram nos Estados Unidos, dentro de uma geração os seus descendentes exibiram um índice de câncer de estômago que é comparável àquele das populações ao redor. Para a grande maioria dos cânceres, o risco da doença parece estar diretamente relacionado com o “ambiente”, que compreende tanto o ambiente físico como o estilo de vida.

Como indicado na Tabela 2.5, a incidência de alguns tipos de câncer pode variar muito de uma população para a outra. Assim, o câncer de mama na China tem cerca de um sexto de ocorrência em comparação com os Estados Unidos ou o norte da Europa. Tendo excluído contribuições genéticas para essa diferença, podemos então concluir que 85% dos cânceres de mama nos Estados Unidos podem, em teoria, ser evitados se as mulheres americanas experimentarem um ambiente e um estilo de vida semelhante àquele das contrapartes chinesas. Mesmo entre a população americana, há vastas diferenças na mortalidade por câncer: os adventistas do sétimo dia, cuja religião não encoraja o tabagismo,

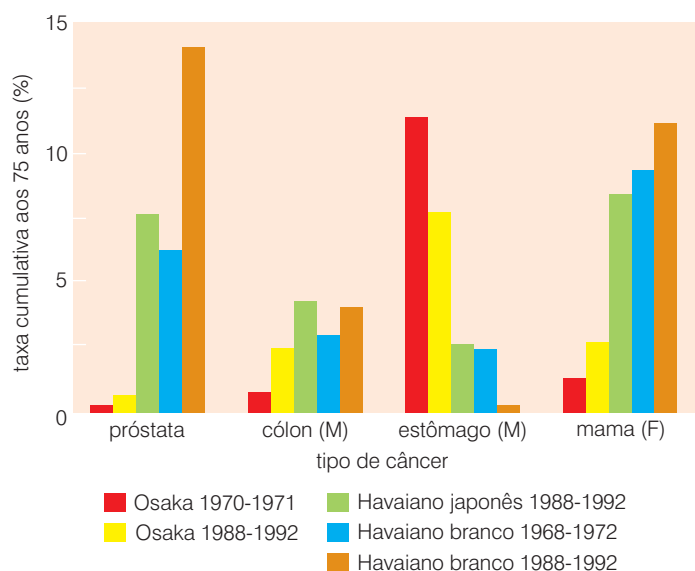


Figura 2.20 Comparação da incidência do câncer de país para país. Registros de saúde pública revelam dramáticas diferenças na incidência de certos tipos de cânceres em diferentes países. Aqui a incidência relativa de um grupo de cânceres no Japão e na ilha do Havaí estão demonstrados. Invariavelmente depois que os japoneses imigraram para o Havaí, ao longo das gerações, suas taxas de câncer se aproximaram daquelas da população que havia se fixado no local antes deles. Isso indica que as diferenças nas taxas de câncer não são devidas a diferenças genéticas entre a população japonesa e a americana. (De J. Peto, *Nature* 411:390-395, 2001.)

o consumo de álcool nem o de carne, morrem de câncer a uma taxa que é somente metade daquela da população em geral.

Para aqueles que pretendem entender o mecanismo **etiológico** (causador) do câncer, tais descobertas levam a uma única conclusão: a grande maioria dos cânceres que ocorrem comumente é causada por fatores ou agentes externos ao corpo, que entram no corpo e de alguma forma atacam e corrompem seus tecidos. Em uma minoria de cânceres, variações substanciais no risco de câncer podem ser atribuídas a diferenças no comportamento reprodutivo e aos efeitos resultantes do meio hormonal dentro de um organismo feminino.

Vamos imaginar, pelo objetivo de argumentação, que o fato de evitar certos fatores óbvios causadores de câncer na dieta e no estilo de vida resultaram em uma redução de 50% no risco de morrer de câncer no oeste dos Estados Unidos, deixando o câncer como causa de cerca de 10% da mortalidade geral nessa população. Nessas condições, dadas as aproximadamente 10^{16} mitoses que ocorrem em cada corpo humano durante um ciclo de vida normal, calculamos que apenas uma em 10^{17} divisões celulares levaria direta ou indiretamente a um câncer clinicamente detectável. Agora nos tornamos convencidos de que, mesmo com a grande chance intrínseca de desenvolver o câncer, o organismo deve ser capaz de construir defesas muito efetivas que normalmente têm sucesso em deter a doença durante os 70 ou 80 anos que a maioria de nós passará nesse planeta. Tais defesas são o conteúdo de muitas discussões ao longo deste livro.

2.7 Os riscos de cânceres freqüentemente parecem estar aumentados por influências transferíveis, incluindo o estilo de vida

A evidência de que certos tipos de cânceres estão associados a exposições específicas ou estilo de vida é bastante antiga, antecedendo a epidemiologia moderna em mais de cem anos. O primeiro relato conhecido surgiu a partir de observações de um médico inglês chamado John Hill, que, em 1761, notou a conexão entre o câncer nasal e o excessivo uso do tabaco. Quatorze anos mais tarde, Percivall Pott, cirurgião em Londres, reportou que havia encontrado um número relativo de casos de câncer de pele no saco escrotal de homens adolescentes que, quando meninos, trabalharam como limpadores de chaminés. Dentro de três anos, a associação dos limpadores de chaminés da Dinamarca encorajou seus operários a tomarem banho regularmente para remover da pele o agente aparentemente causador do câncer. Tal prática foi provavelmente a principal causa na redução do índice de câncer escrotal no continente Europeu quando comparado com a Grã-Bretanha mesmo um século mais tarde.

Com início em meados do século XVI, a prata era extraída em grandes quantidades das minas em St. Joachimsthal, na Bohemia, hoje Jáchymov, na República Tcheca. (As moedas de prata de Joachimsthaler entraram logo em circulação, sendo chamadas de *thaler*, que finalmente gerou a palavra “dólar”!) Na primeira metade do século XIX, foram documentados altos índices de câncer de pulmão em mineradores, uma doença de que quase não se ouvia nada a respeito na época. Mais uma vez uma exposição ocupacional havia sido relacionada com um tipo específico de câncer.

Em 1839, um médico italiano reportou que o câncer de mama estava sendo um castigo em conventos de freiras, estando presente a uma taxa seis vezes maior do que em mulheres da população em geral que tinham dado à luz diversas vezes. Ao final do século XIX, estava claro que a exposição ocupacional e o estilo de vida estavam muito conectados ao câncer e aparentemente causavam inúmeros tipos de câncer.

A abrangência de agentes que poderiam desencadear o câncer expandiu com a descoberta, na primeira década do século XX, de que médicos e outros que usaram o então recentemente inventado tubo de raios X tinham índices aumentados de câncer, freqüentemente desenvolvendo tumores que surgiam no local da irradiação. Tais observações levaram, muitos anos mais tarde, ao entendimento do câncer de pulmão nos mineradores de St. Joachimsthaler: a sua alta taxa no índice de câncer de pulmão poderia ser atribuída aos altos níveis de radioatividade nos minérios vindos dessas minas.

Talvez a associação mais convincente entre exposição ambiental e incidência do câncer tenha sido forjada em 1949 e 1950, quando dois grupos de epidemiologistas reportaram que indivíduos que fumavam cigarros em grandes quantidades corriam um risco de desenvolver câncer de pulmão vinte vezes mais alto do que os não-fumantes. Os resultados iniciais desse estudo que marcou a história do câncer estão mostrados na Tabela 2.6. Tais correlações epidemiológicas provaram ser críticas para posteriores estudos sobre o câncer, pois sugeriam que este freqüentemente possuía causas transferíveis, e que uma cadeia de casualidades poderia um dia ser traçada entre essas recentes causas e as alterações cancerosas observadas em certos tecidos humanos. De fato, na metade do século que seguiu os relatos de 1949 a 1950, epidemiologistas identificaram uma série de fatores ambientais e de estilo de vida que estavam muito relacionados com a incidência de alguns cânceres (Tabela 2.7); em alguns desses casos, pesquisadores estavam aptos a descobrir os mecanismos biológicos específicos pelos quais esses fatores atuam para causar um aumento no índice de alguns desses cânceres.

2.8 Agentes químicos específicos podem induzir o câncer

Condensados de piche de carvão, semelhantes àqueles implicados na causa de câncer pelo trabalho de Percivall Pott, foram usados no Japão no início do século XX para induzir câncer de pele em coelhos. Repetidas pinturas em áreas localizadas da pele das orelhas resultaram, depois de meses, no desenvolvimento de carcinomas. Esse trabalho primeiramente reportado por Katsusaburo Yamagiwa, em 1915, foi pouco reconhecido na comunidade científica internacional da época (Figura 2.21). Na verdade, ele representava um avanço formidável, pois implicava diretamente agentes químicos (aqueles do piche de carvão) na causa do câncer.

Tabela 2.6 Risco relativo de câncer de pulmão em relação ao número de cigarros fumados por dia^a

	Não-fumante		Fumante		
Número de cigarros fumados por dia no início da doença	–	≥ 1, < 5	≥ 5, < 15	≥ 15, < 25	≥ 25
Risco relativo	1	8	12	14	27

^aO risco relativo indica o risco de contrair câncer de pulmão comparado com o de um não-fumante, que foi determinado como 1.

De R. Doll and A.B. Hill, *BMJ* 2:739-748, 1950.

Tabela 2.7 Causas conhecidas ou suspeitas de cânceres humanos

Fatores do ambiente e de estilo de vida conhecidos ou suspeitos de serem causa etiológica de cânceres humanos nos Estados Unidos ^a	
Tipo	% do total de casos ^b
Câncer devido a exposição ocupacional	1-2
Cânceres de estilo de vida	
Relacionados ao tabaco (locais: p. ex., pulmão, bexiga, rim)	34
Dieta (pobre em vegetais, rica em nitratos, sal)	5
(locais: p.ex., estômago e esôfago)	
Dieta (rica em gordura, pobre em fibras, alimentos grelhados/fritos)	37
(locais: p.ex., intestinos, pâncreas, próstata, mama)	
Tabaco e álcool (locais: boca, garganta)	2

Agentes carcinogênicos específicos responsáveis por causar alguns tipos de câncer ^c	
Câncer	Exposição
Carcinoma escrotal	fumaça condensada de chaminé
Angiossarcoma de fígado	cloro vinil
Leucemias agudas	benzeno
Adenocarcinoma nasal	poeira de madeira
Osteossarcoma	rádio
Carcinoma de pele	arsênico
Mesotelioma	asbestos
Carcinoma vaginal	dietilstilbestrol
Carcinoma oral	tabaco

^aAdaptada de *Cancer Facts and Figures*, American Cancer Society, 1990.
^bAcredita-se que um grande número de cânceres sejam provocados por uma dieta com alto valor calórico combinada com vários desses fatores de estilo de vida.
^cAdaptada de S. Wilson, L. Jones, C. Coussens and K. Hanna, eds. *Cancer and the Environment: Gene-Environment Interaction*, Washington, DC: National Academy Press, 2002.

Igualmente importante, o trabalho de Yamagiwa, juntamente com o de Peyton Rous (a ser descrito no Capítulo 3), demonstrou que câncer pode ser induzido como se desejar em animais de laboratório. Antes dessas descobertas, pesquisadores eram obrigados a aguardar o aparecimento espontâneo de tumores em animais selvagens ou domésticos. Agora os cânceres poderiam ser produzidos de acordo com uma escala previsível, freqüentemente envolvendo diversos meses de tratamentos experimentais em animais.



Figura 2.21 A primeira indução de tumores por compostos carcinogênicos (A) Em 1915, Katsusaburo Yamagiwa reportou a primeira bem-sucedida indução de câncer por repetidos tratamentos em orelhas de coelhos com um composto carcinogênico, nesse caso, o piche de carvão. (B) Os carcinomas de pele (seta) que ele induziu nas orelhas desses coelhos foram preservados e encontram-se no museu de medicina da Universidade de Tokyo. Este carcinoma em particular foi colhido e fixado depois de 660 dias de pintura com piche de carvão. (Cortesia de T. Taniguchi.)

Em 1940, químicos britânicos purificaram vários dos componentes do piche de carvão, que era particularmente **carcinogênico** (i. e., causador de câncer), como mostrado pela habilidade desses compostos em induzir cânceres na pele de camundongos de laboratório. Compostos como o 3-metilcolantreno, benzo[*a*]pireno e 1,2,4,5 – dibenz[*a,h*]antraceno eram produtos comuns da combustão, e alguns desses hidrocarbonetos, especialmente o benzo[*a*]pireno, eram subsequenteemente encontrados também em condensados de fumaça de cigarro (Figura 2.22). Tais descobertas sugeriram que certas espécies químicas que entravam no organismo humano poderiam perturbar tecidos e células e, no final, provocar o surgimento de um tumor. O mesmo poderia ser dito para raios X, que também eram capazes de produzir cânceres ostensivamente por meio de um mecanismo de ação um pouco diferente.

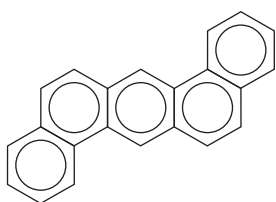
Enquanto tais descobertas eram reportadas, uma linha independente de pesquisa que retratou o câncer como uma doença infecciosa estava sendo desenvolvida. Como descrito detalhadamente no Capítulo 3, pesquisadores, na primeira década do século XX, descobriram que vírus poderiam causar leucemias e sarcomas em galinhas infectadas. Em meados do século, foi observado que uma grande variedade de vírus era capaz de induzir o câncer em coelhos, galinhas, camundongos e ratos. Como consequência, aqueles com a intenção de desmascarar as origens do câncer em humanos foram puxados para três direções distintas, visto que a evidência de câncer causado por agentes químicos, virais e físicos (i. e., radiação) tornou-se convincente.

2.9 Tanto carcinogênicos físicos como químicos atuam como mutagênicos

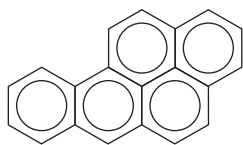
A confusão causada pelas três teorias competidoras de carcinogênese foi reduzida significativamente por descobertas realizadas no campo da genética da mosca-das-frutas. Em 1927, Hermann Muller descobriu que poderia induzir mutações no genoma de *Drosophila melanogaster* expondo-as a raios X. Mais importante, essa descoberta revelou que o genoma de um animal era mutável, ou seja, que este conteúdo de informação poderia ser alterado por meio de tratamentos específicos, notavelmente irradiação. Ao mesmo tempo, ele sugeriu ao menos um mecanismo pelo qual raios X poderiam induzir o câncer: a radiação possivelmente era capaz de mutar os genes de células normais, criando assim células mutantes que cresciam de maneira maligna.

No final da década de 1940, foi observado que uma série de compostos, muitos deles agentes alquilantes do tipo dos que haviam sido utilizados na I Guerra Mundial (gás de mostarda), também eram **mutagênicos** para a mosca-das-frutas. Logo depois, foi observado que alguns

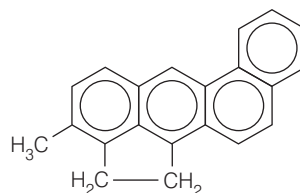
Figura 2.22 Estruturas de hidrocarbonetos carcinogênicos Essas espécies químicas se desenvolvem a partir da combustão incompleta de compostos orgânicos (i. e., que contenham carbono). Cada uma das estruturas químicas mostradas aqui, que já foram determinadas antes de 1940, representa uma espécie química que se descobriu ser potencialmente carcinogênica depois de purificada. Os quatro compostos na fileira de cima são hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs). (De E. C. Miller, *Cancer Res.* 38: 1479-1496, 1978.)



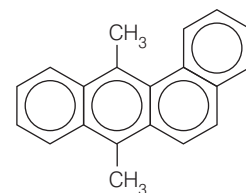
dibenz[*a,h*]antraceno



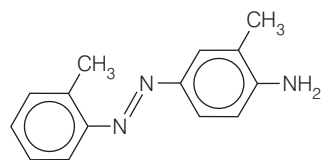
benzo[*a*]pireno



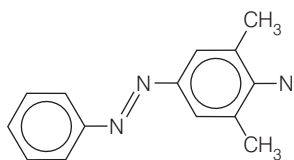
3-metilcolantreno



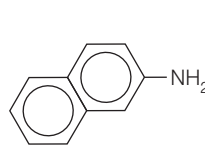
7,12-dimetilbenz[*a*]antraceno



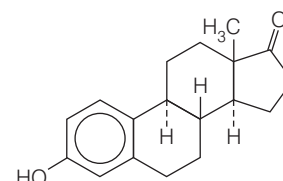
2',3-dimetil-4-amino-azobenzeno



N,N-dimetil-4-amino-azobenzeno



2-naftilamina



estrona

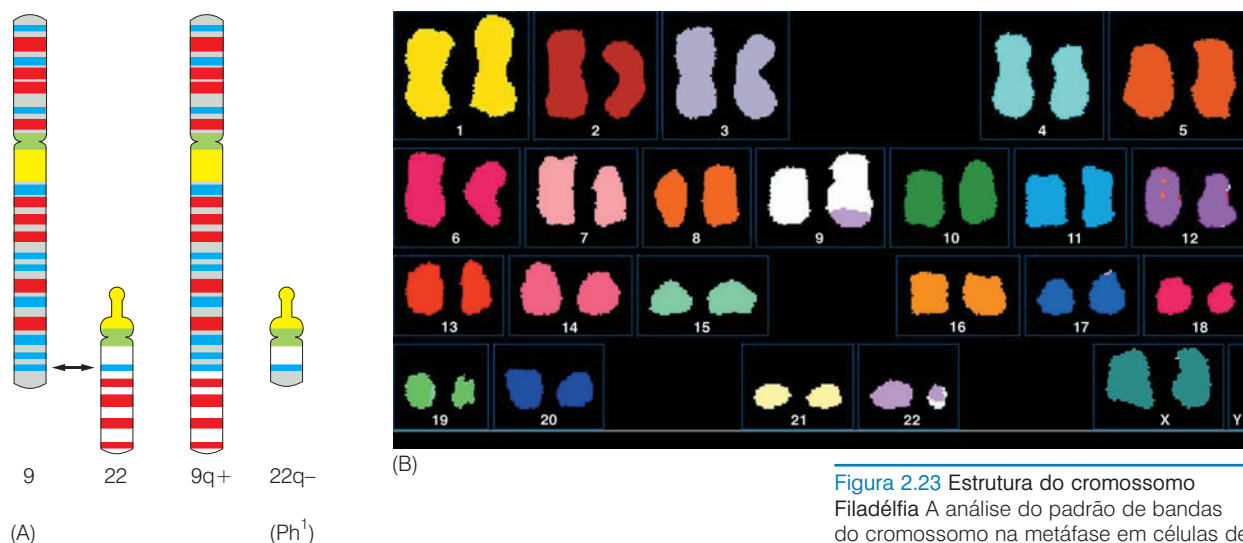


Figura 2.23 Estrutura do cromossomo Filadélfia A análise do padrão de bandas do cromossomo na metáfase em células de leucemia mielogênica crônica (CML) demonstrou, pela primeira vez, o pequeno cromossomo característico (chamado de "cromossomo Filadélfia" ou Ph¹), que está presente na grande maioria das células de CML. (A) Este padrão de bandas, determinado por meio de análise por microscópio óptico dos cromossomos corados em metáfase, está ilustrado aqui esquematicamente. Enquanto a translocação cromossomal que gera os dois cromossomos alterados (9q+, 22q-) é *recíproca* (i. e., envolve uma perda e um ganho por cada um dos dois cromossomos), os tamanhos dos braços dos trocados dos cromossomos são diferentes, levando ao Cromossomo 22 truncado (i. e., 22q-). A seta indica o ponto de *crossing-over*, conhecido como o ponto de quebra da translocação. (B) A alteração relativamente menor que ocorre no cariótipo de uma célula tumoral criada pela translocação CML é aparente nessa análise SKY, na qual são utilizadas sondas específicas para cada cromossomo, juntamente com corantes fluorescentes e colorações geradas por computadores, para visualizar por completo a complementação cromossomal de células CML. Como pode ser visto, um dos dois Cromossomos 9 adquiriu um segmento *roxo-claro* (uma cor designada para o Cromossomo 22) no final de seu braço longo. De forma recíproca, um dos dois Cromossomos 22 adquiriu uma região branca (característica do Cromossomo 9) no final de seu braço longo. (A, de B. Alberts et al., *Molecular Biology of the Cell*, 4th ed. New York: Garland Science, 2002; B, cortesia de Thomas Ried and Nicole McNeil.)

desses mesmos compostos eram carcinogênicos para animais de laboratório. Essas descobertas fizeram com que diversos geneticistas especulassem que o câncer era uma doença de genes mutantes e que agentes carcinogênicos, como os raios X e certos compostos, tiveram sucesso em induzir câncer por meio de sua habilidade de mutar genes.

Tais especulações foram pioneiras nesse contexto. No início de 1914, o biólogo alemão Theodor Boveri, divagando em antigas observações de outros, sugeriu que os cromossomos, os quais carregavam a informação genética, eram uma aberração nas células cancerosas e que essas células poderiam ser mutantes. As idéias de Boveri, junto com outras especulações sobre a origem do câncer, ganharam alguns partidários, até que, em 1960, foi descoberta a configuração anormal de um cromossomo em uma grande proporção de casos de leucemia mielogênica crônica (CML). Esse cromossomo, chamado de cromossomo *Philadelphia* pelo lugar da sua descoberta, era uma característica claramente distinta do referido tipo de câncer (Figura 2.23). A sua associação reproduzível com essa classe de células tumorais sugeriu, mas não comprovou, que ele possuía um papel causal na tumorigênese.

Em 1975, o geneticista bacteriano Bruce Ames, enquanto trabalhava na universidade da Califórnia, em Berkeley, divulgou resultados de experimentos que contribuíssem em grande peso para a teoria de que os carcinogênicos podem funcionar como mutagênicos. Décadas de experimentos com ratos e camundongos de laboratório demonstraram que compostos carcinogênicos atuavam em ampla diferença potencial, diferenciando-se em um milhão de vezes na sua habilidade em induzir os cânceres. Esses experimentos mostraram, por exemplo, que um micrograma de aflatoxina, um composto produzido por fungos gerados em amendoins e trigo, era um potente carcinogênico, 10 mil vezes maior do que o composto sintético benzidina. Ames colocou a questão se esses diversos compostos eram mutagênicos; mais especificamente, se os compostos que eram potentes carcinogênicos poderiam vir a ser potentes mutagênicos.

A dificuldade que Ames encontrou em seus esforços iniciais para abordar essa questão era simples: não havia nenhuma boa maneira de se medir os potenciais mutagênicos relativos de diversas espécies químicas. Assim, Ames desenvolveu seu próprio método para quantificar o potencial mutagênico. Ele desenvolveu um protocolo experimental que consistia na aplicação de compostos carcinogênicos em uma população da bactéria *Salmonella* em crescimento em placas de Petri e, então, no registro das habilidades desses carcinógenos para mutar a bactéria. Era observado o número de colônias de *Salmonella* que crescia após a exposição a um ou outro composto.

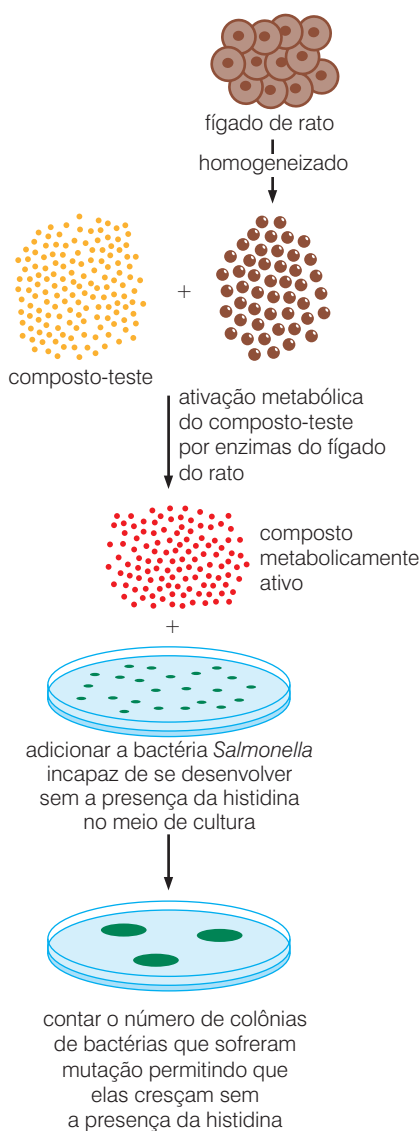


Figura 2.24 Teste de Ames para avaliar a mutagenicidade O teste de Ames tornou possível estimar quantitativamente o potencial mutagênico de um composto em teste. Inicialmente, o fígado de um rato (ou outra espécie) é homogeneizado, liberando enzimas que podem ativar metabolicamente um composto para sua forma mutagênica. O homogeneizado de fígado de rato (*pontos marrons*) é então misturado com o composto-teste (*laranja*), que frequentemente resulta na conversão do composto-teste em um composto de estado quimicamente ativado (*vermelho*). Essa mistura (que ainda contém o homogeneizado de fígado, *não mostrado*) é colocada em uma placa onde está a bactéria mutante *Salmonella* (*pequenos pontos verdes*), que requer a presença do aminoácido histidina no seu meio de cultura para se desenvolver. Como a histidina não foi adicionada ao meio, somente aquelas bactérias que são mutadas para um genótipo independente de histidina (e fenótipo) serão capazes de crescer, e cada uma dessas gerará uma grande colônia (*verde*) que pode ser vista à olho nu e contada, indicando quantas bactérias mutantes (e conseqüentemente alelos mutantes) foram geradas em função da rápida exposição ao composto ativado.

Mais detalhadamente, Ames utilizou uma cepa de *Salmonella* que já era um mutante e, assim, era incapaz de crescer em meio de cultura desprovido do aminoácido histidina. O alelo mutante que causava esse fenótipo era suscetível à retromutação para um alelo tipo selvagem. Uma vez que o alelo tipo selvagem era formado em resposta à exposição a um mutagênico, uma bactéria carregando esse alelo tornou-se capaz de se desenvolver no meio seletivo de Ames, multiplicando-se até formar uma colônia que poderia ser registrada a olho nu (Figura 2.24).

Em princípio, Ames precisava somente introduzir um composto-teste à placa de Petri contendo sua cepa especial de *Salmonella*. Por meio da contagem do número de colônias de bactérias que surgiram, ele poderia mensurar o potencial mutagênico do composto. Porém ainda permanecia um obstáculo substancial para o sucesso desse ensaio de mutagênese. Estudos detalhados de uma série de compostos carcinogênicos mostraram que depois que as moléculas carcinogênicas entravam nos tecidos dos animais de laboratório, elas eram metabolizadas em outras espécies químicas. Na maioria dos casos, os produtos resultantes do metabolismo, em vez dos compostos inicialmente introduzidos, pareciam ser os agentes diretamente responsáveis pela observada indução do câncer. Observou-se que esses compostos metabolizados eram muito reativos quimicamente e capazes de formar ligações covalentes com várias macromoléculas que se sabia estarem presentes nas células – DNA, RNA e proteína.

Os compostos originais não-modificados que foram introduzidos nos animais de laboratório foram chamados de **pró-carcinógenos**, para indicar sua habilidade de se converter em um composto carcinogênico ativo, os quais foram chamados de **carcinógenos finais**. Essa conversão química complicou o desenho do ensaio de mutagênese de Ames. Se muitos compostos requerem ativação metabólica antes de sua carcinogenicidade se tornar aparente, parecia plausível que seus poderes mutagênicos somente seriam evidentes depois dessa conversão metabólica. Dados os mecanismos radicalmente diferentes de células bacterianas e de mamíferos, era muito improvável que a bactéria *Salmonella* de Ames fosse capaz de realizar a ativação metabólica de pró-carcinógenos em tecidos de animais de laboratório.

Essa informação forçou Ames a adicionar um passo extra a seu ensaio de mutagênese, um passo sugerido por trabalhos anteriores de outros pesquisadores. Sabia-se que uma grande quantidade de compostos que entram no organismo sofria uma conversão metabólica no fígado. Muitas dessas conversões podem ser realizadas em tubos de ensaio simplesmente misturando os compostos com homogeneizado de fígado. Então Ames misturou homogeneizado de fígado de rato com os compostos-teste e introduziu essa mistura nas placas de Petri que continham *Salmonella*. (Sabemos que a ativação metabólica de pró-carcinógenos no fígado é, na maioria das vezes, mediada por enzimas que em geral estão envolvidas, paradoxalmente, na **detoxificação** dos compostos introduzidos no organismo; veja a Seção 12.6)

Quando Ames adicionou a sua cultura de *Salmonella* o homogeneizado de fígado, seu ensaio de potencial de mutagênico funcionou brilhantemente. Ele revelou que diversos carcinóge-

nos já conhecidos também eram ativamente mutagênicos. Ainda mais importantes foram as correlações que Ames encontrou. Compostos que eram potentemente mutagênicos também eram poderosos carcinógenos. Aqueles que eram pouco mutagênicos induziam câncer pobremente. Tais correlações, analisadas em gráficos por outros estudiosos, se estenderam por mais de cinco ordens de magnitude de potência (Figura 2.25).

Como vimos anteriormente, a idéia de que carcinógenos são mutagênicos antecede o trabalho de Ames por um quarto de século. Apesar de tudo, os resultados de sua análise atraíram pesquisadores interessados na origem do câncer, uma vez que eles se dedicaram tão diretamente à relação entre carcinógeno e mutagênico. Suas razões seguiram desta forma: Ames havia demonstrado o poder mutagênico de alguns compostos químicos em bactéria. Como os genomas, células bacterianas e de animais são, ambas, formadas pelas mesmas substâncias químicas – DNA dupla fita. Provavelmente os compostos que induziam mutações no genoma de *Salmonella* eram também capazes de induzir mutações no genoma de células animais. Portanto, o “teste de Ames”, como se tornou conhecido, deveria ser capaz de prever a mutagenicidade desses compostos depois de eles serem introduzidos no organismo de um mamífero. E, com a correlação entre potencial mutagênico e carcinogênico, o teste de Ames poderia ser empregado para realizar uma triagem de várias substâncias pelo seu poder carcinogênico e, dessa forma, pela sua ameaça à saúde humana. Em 1976, Ames e seu grupo reportaram sobre o potencial mutagênico de 300 compostos orgânicos distintos. Outros testes para medir o potencial mutagênico foram desenvolvidos nos anos seguintes (Barra lateral 2.1).

Os resultados de Ames levaram a uma próxima dedução; na verdade, mais uma especulação: se, como argumentou Ames, carcinógenos são mutagênicos, então o poder carcinogênico de diversos agentes deriva diretamente da sua habilidade de induzir mutações nas células de tecidos-alvo. Como posterior dedução, parecia inevitável que as células cancerosas geradas por compostos carcinógenos carregassem genes mutados. Esses genes mutados, independentemente de sua identidade, devem, de alguma maneira, ser responsáveis pelos fenótipos de crescimento aberrantes de tais células cancerosas.

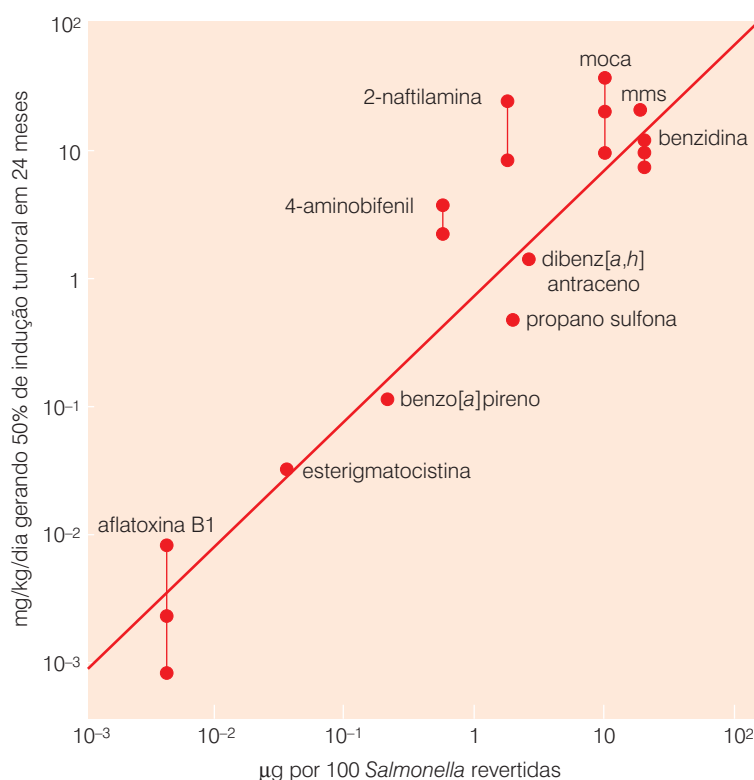


Figura 2.25 Potencial mutagênico versus carcinogênico Neste gráfico log-log, as potências carcinogênicas relativas de um grupo de compostos (*ordenada*) que têm sido usados para tratar animais de laboratório (ratos e camundongos) estão arranjadas em função de seu potencial mutagênico (*abscissa*), como avaliado no teste de Ames (veja a Figura 2.24). Como ambas, ordenada e abscissa, estão arranjadas de acordo com a quantidade de composto necessário para se obter um efeito observável (formando tumores em 50% dos animais tratados ou 100 colônias da bactéria *Salmonella* mutante, chamados aqui de “revertidos”), os compostos com maior poder mutagênico e carcinogênico aparecem no canto esquerdo inferior do gráfico. Note que ambos os parâmetros variam na ordem de 5 na magnitude. (Adaptada de M. Meselson et al., in H.H. Hiatt et al., eds., *Origins of Human Cancer*, Book C: Human Risk Assessment. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1977.)

Barra Lateral 2.1 Outros testes para mutagenicidade ajudam a avaliar uma possível carcinogenicidade O teste de Ames é apenas um de diversos sistemas de ensaios biológicos que podem ser usados para avaliar o potencial mutagênico de supostos compostos carcinogênicos. Muitos desses outros ensaios dependem da exposição de células de mamíferos diretamente aos compostos químicos sendo testados, e do uso subsequente de um arranjo diverso de leituras biológicas. Por exemplo, o teste para troca de cromátide irmã (SCE) depende da habilidade de se medir o *crossing-over* entre duas cromátides pareadas que juntas constituem um cromossomo na fase final (i. e., G_2) de um ciclo de crescimento e divisão celular. Foi observado que muitos agentes mutagênicos provocam essa SCE. Agentes mutagênicos também se mostraram capazes de induzir a formação de núcleo celular fragmentado, isto é, **micronúcleo**. O uso da genética tornou possível testar células de mamíferos para a perda, induzida por mutação, da enzima timidina cinase ou da enzima HGPRT (hipoxantina guanina fosforribosil transferase).

A habilidade de se examinar o arranjo cromossomal de células durante a metáfase da mitose, sob o microscópio óptico, tornou possível a triagem para aberrações cromossomais inferidas por compostos-testes. Ainda um outro ensaio avalia o grau de marcação de DNA naquelas células que estão em fase G_1 ou G_2 do ciclo celular (descrito no Capítulo 8); tal marcação da fase não-S, referida muitas vezes como “síntese de DNA não-programada”, também se mostrou um bom indicador de dano genômico que foi inferido em uma cultura de células, uma vez que esse tipo de síntese de DNA representa um passo-chave no processo utilizado por células para reparar dano de DNA.

Nenhum desses testes comprovou ser ideal para predição de carcinogenicidade de uma substância teste. O teste de Ames, por exemplo, foi descoberto por ter uma sensibilidade (% de carcinógenos estabelecidos identificados como mutagênicos) de aproximadamente 54% e uma especificidade (% de não-carcinógenos identificados como não-mutagênicos) de 70%.

Essa lógica se estendeu também para carcinogênese dos raios X. Como os raios X eram mutagênicos e carcinógenos, seguiu então que eles também induziam câncer pela sua habilidade de mutar os genes. Essa convergência na pesquisa genética sobre o câncer possuiu um profundo efeito na intenção de pesquisadores em descobrir a origem do câncer. Mesmo ainda não estando comprovado, provavelmente a doença do câncer poderia ser entendida nos termos de genes mutantes carregados por células cancerosas.

2.10 Mutagênicos podem ser responsáveis por alguns cânceres humanos

A conexão entre carcinogênese e mutagênese pareceu irradiar luz sobre como se desenvolvem os tumores humanos. Talvez muitos desses neoplasmas fossem a consequência direta de ações mutagênicas de carcinógenos químicos e físicos. Compostos mutagênicos, mais especificamente pró-carcinógenos, não precisam derivar exclusivamente a partir da combustão de compostos de carbono e nem da formação resultante de piche de carvão. Parecia plausível que espécies químicas presentes naturalmente na matéria-prima dos alimentos ou geradas durante o cozimento também pudessem induzir o câncer. Mesmo se muitos alimentos não contivessem carcinógenos finais, as conversões químicas realizadas pelas células hepáticas ou pelas bactérias abundantes no cólon poderiam ter sucesso em criar espécies químicas ativamente mutagênicas e, assim, carcinogênicas.

Enquanto o estudo sobre as causas do câncer humano procedia, tornou-se visível que todos os compostos que são mutagênicos em células humanas provavelmente seriam também carcinogênicos. Entretanto, o contrário não parecia se manter: compostos químicos que são carcinogênicos não são necessariamente mutagênicos (veja a Barra lateral 2.2).

Em 1991, Ames e outros pesquisadores usaram esse teste para catalogar o potencial mutagênico de um grupo de diversas matérias-primas de alimentos, químicas e naturais, incluindo muitas das plantas que são comuns e abundantes na dieta ocidental. Como argumentou Ames, a presença de tais compostos na matéria-prima dos alimentos derivados de plantas foi surpreendente, uma vez que as plantas desenvolveram milhares, possivelmente milhões, de compostos químicos tóxicos distintos para se protegerem da predação de insetos e animais maiores. Alguns desses compostos naturalmente tóxicos, inicialmente desenvolvidos como defesas antipredadores, poderiam também, como um efeito colateral não intencional, ser mutagênicos (Tabela 2.8).

Uma ampla série de descobertas levou ao modelo que permanece não-comprovado, em muitos aspectos, o qual diz que uma proporção significativa dos cânceres humanos é atribuída

Barra lateral 2.2 Nem todos os carcinógenos são mutagênicos No início dos anos 1990, tornou-se aparente que a equivalência carcinógeno-mutagênico não mais se aplicava. Até então, o uso extensivo dos testes de Ames mostrara que cerca de 40% dos compostos conhecidos por serem carcinogênicos em roedores não mostrara mutagenicidade óbvia nos ensaios de mutação em *Salmonella*. Com isso, as conclusões previamente determinadas das aplicações do teste de Ames requereu uma maior revisão: alguns carcinógenos atuam por sua capacidade de mutar DNA, enquanto outros promovem o surgimento de tumores por meio de mecanismos não-genéticos. Vamos encontrar esses carcinógenos não-mutagênicos, com frequência chamados de tumores **promotores**, novamente no Capítulo 11.

diretamente ao consumo de matérias-primas de alimentos que são mutagênicos e, portanto carcinogênicos. Dentre essas matérias-primas de alimentos está, por exemplo, a carne vermelha, que ao ser cozida em altas temperaturas gera compostos como aminas heterocíclicas que são potencialmente mutagênicas (veja a Seção 12.6).

As dificuldades em comprovar esse modelo derivam de diversas fontes. Cada uma das matérias-primas de alimentos vegetais ou animais na nossa dieta é composta por milhares de diferentes espécies químicas presentes em concentrações completamente distintas. Quase todos esses compostos sofrem conversões metabólicas, uma vez que eles estão dentro do nosso organismo, primeiramente no trato gastrointestinal e, logo após, no fígado. Por consequência, o número de espécies químicas distintas que são introduzidas no nosso organismo é incalculável. Cada um desses compostos introduzidos, uma vez presentes no organismo podem então ser concentrados em algumas células e ser rapidamente metabolizados e excretados. Isso gera uma ampla dimensão de complexidade.

Além disso, a atual mutagenicidade de vários compostos em diferentes tipos celulares pode variar enormemente em função das diferenças metabólicas nessas células. Por exemplo, algumas células, como os **hepatócitos**, no fígado, expressam altos níveis de espécies bioquímicas designadas a encontrar e inativar compostos mutagênicos, enquanto outras, como os fibroblastos, expressam níveis muito mais baixos. Em suma, a habilidade de relacionar a mutagenicidade da matéria-prima dos alimentos às taxas atuais de mutagênese e carcinogênese no corpo humano está além do nosso alcance atualmente – um problema de complexidade intratável (veja a Barra lateral 2.3).

2.11 Sinopse e perspectivas

As descrições de câncer e de células cancerosas desenvolvidas durante a segunda metade do século XIX e a primeira metade do século XX indicaram que tumores não eram nada mais que populações celulares normais com instinto assassino. Além disso, muitos tumores pareciam ser compostos, em grande parte, de descendentes de uma única célula que ultrapassou a barreira da normalidade para a malignidade e gerou bilhões de células descendentes que

Tabela 2.8 Uma amostra da lista de Bruce Ames dos carcinógenos identificados na dieta normal^a

Matéria-prima do alimento	Composto	Concentração na matéria-prima do alimento
Pimenta preta	piperina	100 mg/g
Cogumelo comum	agaritina	3 mg/g
Aipo ^b	furocumarina, psoralens	1 µg/g, 0,8 µg/g
Ruibarbo	antraquinonas	varia
Pó de chocolate	teobromina	20 mg/g
Mostarda, rábano silvestre	isotiocianato de alil	varia
Broto de alfafa	canavanina ^c	15 mg/g
Material carbonizado ^d	grande quantidade	varia
Café	ácido cafêico	11,6 mg/g

^aAmes citou 37 compostos naturais que se mostraram como carcinógenos em animais de laboratório; um ou mais têm sido encontrados nas seguintes matérias-primas de alimentos: absinto, pimenta inglesa, anis, maçã, damasco, banana, basilico, beterraba, brócolis, couve de Bruxelas, repolho, melão, cominho, cardamomo, cenoura, couve-flor, aipo, cereja, pimenta, chocolate, canela, cravo, café, chá de erva de confrei, coentro, milho, groselha, endro, berinjela, endívia, funcho, alho, toronja, uva, goiaba, mel, melão de mel, rábano silvestre, limão, lentilha, alface, licopódio de erva rasteira, lima, cetiro, manga, mangerona, menta, cogumelos, mostarda, noz moscada, cebola, laranja, páprica, salsa, pastinaca, pêssego, pêra, ervilha, pimenta preta, abacaxi, ameixa, batata, rabanete, framboesa, ruibarbo, alecrim, salva, gergelim, soja, flor de anis, losna, chá, tomilho, tomate, tempero de açafrão e nabo.

^bEsses níveis podem ter um aumento de 100 vezes no caso de plantas doentes.

^cA canavanina é indiretamente genotóxica por causa dos radicais de oxigênio que são liberados, possivelmente durante as reações inflamatórias associadas à eliminação de proteínas contendo canavanina.

^dNa média, diversos gramas de material carbonizado são consumidos diariamente na forma de crostas de pão, pão torrado e superfícies queimadas de carnes cozidas a altas temperaturas.

Adaptada de B.N Ames, *Science* 231: 1256-1264, 1983; B.N. Ames e L.S. Gold, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 7777-7781, 1990; and L.S. Gold, B.N. Ames and T. H. Slone, *Misconceptions about the causes of cancer*, in D. Paustenbach, ed., *Human and Environmental Risk Assessment: Theory and Practice*, New York: John Wiley & Sons, 2002, pp. 1415-1460.

Barra lateral 2.3 A busca por carcinógenos humanos evasivos Idealmente, a identificação de carcinógenos humanos importantes deveria ter sido auxiliada pelo uso de ensaios *in vitro*, como o teste de Ames (Seção 2.9) e testes *in vivo* – exposição de animais de laboratórios a agentes suspeitos de causarem câncer (Seção 2.8). Entretanto, esses vários tipos de testes laboratoriais falharam ao registrar importantes carcinógenos humanos. Em vez disso, aprendemos sobre carcinogenicidade em

função de vários estudos epidemiológicos. Por exemplo, o carcinógeno humano mais importante conhecido – fumaça do tabaco – provavelmente teria escapado de ser detectado por ser um carcinógeno relativamente fraco em roedores de laboratório; e um outro carcinógeno humano conhecido – asbesto – provavelmente teria esquivado a detecção tanto por testes laboratoriais *in vivo* como *in vitro*. Contraditoriamente, algumas drogas utilizadas com frequência, como fenobarbital e isoniazi-

da, foram registradas positivamente no teste de Ames, e a sacarina mostrou-se ser um carcinógeno em ratos machos de laboratório (veja a Barra lateral 11.16), mas evidências epidemiológicas indicaram conclusivamente que nenhum desses compostos estão associados ao aumento do risco de câncer em humanos que tenham sido expostos a eles por longos períodos. Portanto, o desenvolvimento de testes realmente úteis, preditivos para carcinógenos humanos, ainda está no futuro.

constituem essas massas neoplásicas. Esse cenário chamou atenção para a natureza das células que geraram tumores e para os mecanismos que as levaram a se transformar em células cancerosas. Parece que cada massa tumoral era composta amplamente de réplicas dessas células fundadoras transformadas. Se fosse possível entender o porquê da multiplicação incontrolável dessas células de alguma maneira outras partes do quebra-cabeça do câncer poderiam ser encaixadas.

Além disso, observações relevantes e técnicas experimentais ofereceram poucas perspectivas de revelar precisamente por que uma célula altera seu comportamento, transformando-se de normal para uma célula maligna. A teoria do carcinógeno = mutagênico pareceu fornecer alguma clareza, uma vez que implicou genes celulares mutantes como sendo os agentes responsáveis pelo desenvolvimento de doenças e, por conseguinte, pelo comportamento aberrante de células cancerosas. Talvez existissem genes mutantes operando dentro das células cancerosas que programaram a proliferação exacerbada dessas células, mas as perspectivas para descobrir tais genes e entender as suas ações pareceram remotas. Ninguém sabia quantos genes estavam presentes no genoma humano e como analisá-los. Se genes mutantes realmente contribuíram muito para a causa do câncer, provavelmente eles seriam poucos em número e definhariam pelo aparentemente grande número de genes presentes no genoma como um todo. Eles pareciam ser “agulhas no palheiro”; nesse caso, um palheiro de tamanho indeterminado.

Tais teorias sobre a origem do câncer tornaram-se complicadas por duas novas considerações importantes. Primeiro, vários carcinógenos aparentes falharam no teste de Ames, fornecendo fortes sugestões de que não eram mutagênicos. Segundo, certas infecções virais pareciam estar bastante relacionadas com a incidência de um pequeno, porém significativo, subgrupo de tipos de câncer humano. De algum modo, seus poderes carcinogênicos tiveram de ser reconciliados com as ações de carcinógenos mutagênicos e genes celulares mutantes.

Em meados da década de 1970, a tecnologia do DNA recombinante, incluindo a clonagem de genes, começou a influenciar a ampla variedade de áreas de pesquisa biomédica. Ao mesmo tempo que apreciavam os poderes dessa nova tecnologia de isolar e caracterizar genes, pesquisadores do câncer permaneciam frustrados em relação a como eles deveriam proceder para explorá-la para localizar os genes mutantes elusivos que eram responsáveis pelo câncer. No entanto, uma coisa estava clara. Mais cedo ou mais tarde, o processo de **patogênese** (desenvolvimento da doença) do câncer necessitaria ser explicado e compreendido em termos moleculares. De alguma forma, o paradigma do DNA, RNA e proteínas, tão poderoso na elucidação de uma ampla variedade de processos biológicos, necessitaria ser trazido a vida no problema do câncer.

No final, o atalho que abriu essa obstrução veio de estudos de tumores virais, que na maioria das vezes eram pequenos participantes no desenvolvimento de câncer em humanos. Tumores virais eram geneticamente simples e ainda assim possuíam potentes poderes carcinogênicos. Para compreender esses vírus e a sua importância, precisamos voltar mais uma vez para o

início do século XX e confrontar uma outra das antigas raízes da pesquisa moderna do câncer. Faremos isso no Capítulo 3.

Conceitos-chave

- A descoberta, no século XIX, de que todas as células de um organismo descendem de óvulos fertilizados levaram à conclusão de que tumores não são corpos estranhos, mas sim crescimentos derivados de tecidos normais. A arquitetura comparativa desorganizada de tecidos de tumores apontou o câncer como sendo uma doença de células em mau funcionamento.
- Tumores podem ser tanto benignos (localizados, não-invasivos) como malignos (invasivos, metastáticos). As metástases semeadas pelos tumores malignos são responsáveis por quase todos os óbitos causados por câncer.
- Tumores são classificados em quatro grandes grupos de acordo com sua origem (epitelial, mesenquimal, hematopoética e neuroectodermal).
- Virtualmente todos os tipos celulares no organismo podem dar origem ao câncer, porém os cânceres humanos mais comuns são os de origem epitelial – os carcinomas. A maioria dos carcinomas é subdividida em duas categorias: os carcinomas de célula escamosa, que se desenvolvem a partir do epitélio que forma camadas celulares protetoras, e os adenocarcinomas, que se desenvolvem a partir de epitélio secretor.
- Tumores malignos não-epiteliais incluem (1) sarcomas, que se originam de células mesenquimais; (2) cânceres hematopoéticos, que se desenvolvem de células dos sistemas circulatório e imune; e (3) tumores neuroectodermais, que se desenvolvem a partir de componentes do sistema nervoso.
- Alguns tumores não se encaixam nesse esquema de classificação. Além disso, ocasionalmente a origem de um tumor pode não ser identificada em função de suas células terem se desdiferenciado (perderam todas as características tecido-específicas); tais tumores são ditos anaplásticos.
- Cânceres parecem se desenvolver progressivamente, com os tumores demonstrando diferentes graus de anormalidade ao longo do trajeto de benigno para metastático.
- Tumores benignos podem ser hiperplásticos ou metaplásticos. Tecidos hiperplásticos são aparentemente normais, exceto por um excessivo número de células, enquanto os tecidos metaplásticos mostram deslocamento de células normais por tipos celulares normais que em geral não são encontrados naquele local. A metaplasia é mais freqüente em zonas de transição epitelial.
- Tumores displásicos contêm células que são citologicamente anormais. Displasia é um estado de transição entre completamente benigno e pré-maligno. Crescimentos adenomatosos (adenomas, pólipos, papilomas e verrugas) são tumores epiteliais displásicos que são considerados benignos em função de respeitarem o limite criado pela membrana basal.
- Tumores que alcançam a membrana basal e invadem o tecido subjacente são ditos malignos. Um grau ainda maior de anormalidade em metástases é a semeadura de colônias tumorais em diferentes locais no corpo. A metástase não requer somente invasividade, mas também novas características adquiridas, como mobilidade e adaptação a ambientes diferentes.
- Marcadores genéticos e bioquímicos são usados para determinar se tumores humanos são monoclonais (descendem de uma única célula ancestral) em vez de policlonais (descendem de diferentes subpopulações celulares), embora fatores confusos possam mascarar a verdadeira natureza da origem do tumor.
- Embora a incidência de alguns cânceres (p.ex., alguns dos pediátricos) seja comparável em todo o mundo, muitos variam dramaticamente por país e, por isso, não podem ser causados apenas por um processo biológico normal que ocorreu erroneamente ao acaso. Diferenças de hereditariedade ou ambientais podem explicar bem essas variações; estudos epidemiológicos mostraram que o ambiente é o determinante dominante das variações entre países na incidência do câncer.

- Pesquisas laboratoriais deram suporte aos estudos epidemiológicos pela implicação direta de agentes químicos e físicos (tabaco, poeira de minério e raios X) como causa de cânceres. No entanto, a possibilidade de o câncer ser uma doença infecciosa surgiu quando foram encontrados vírus que causam leucemias e sarcomas em galinhas.
- Um possível mecanismo que deu suporte a carcinogênese por agentes químicos e físicos surgiu em 1927, quando mutações foram induzidas na mosca-das-frutas expondo-a a raios X. Em 1950, uma série de compostos também foi considerada mutagênica para a mosca-das-frutas e carcinogênica em animais de laboratório. Isso levou à especulação de que o câncer era doença de genes mutantes e que agentes carcinogênicos induziam o câncer pela sua habilidade de mutar genes.
- Em 1975, o teste de Ames forneceu suporte para essa idéia mostrando que muitos carcinógenos atuam como mutagênicos. Entretanto, outras pesquisas mostraram que quase todos compostos que são mutagênicos provavelmente são carcinógenos, mas o contrário não é verdade. Então, alguns carcinógenos atuam pela sua habilidade de mutar DNA, enquanto que outros promovem tumorogênese pelo mecanismo não genético. Tais carcinógenos não mutagênicos são chamados de promotores tumorais.
- O teste de Ames combinado com outras descobertas levou ao modelo, ainda não comprovado, de que uma significativa porção dos cânceres humanos é diretamente atribuída ao consumo de matérias primas de alimentos que são mutagênicas, e por sua vez, carcinogênicas.

Questões elaboradas

1. Que tipos de observações possibilitaram que um patologista treinado identifique o tecido de origem do tumor? E por que é muito difícil de determinar o tecido específico de origem de certos tumores (5 a 10%)?
2. Sob certas circunstâncias, todos os tumores de uma classe podem ser traçados a uma camada celular embrionária específica, enquanto em outras classes de tumores isso não é possível. Que tipos de tumores se encaixariam em cada um desses dois grupos?
3. Qual evidência nos convence de que um câncer se desenvolve a partir de tecidos nativos de um indivíduo em vez de invadir o corpo pelo lado de fora e, assim, ter uma origem externa?
4. Quão convincente são os argumentos para monoclonalidade de uma população de células tumorais e qual lógica e observações questionam a conclusão de monoclonalidade?
5. Como podemos estimar qual porcentagem de cânceres em uma população são impedidos (por meio de diferentes estilos de vida) e em qual porcentagem eles ocorrem devido a uma incidência inevitável que atinge a população independentemente dos estilos de vida específicos?
6. Quais limitações o teste de Ames possui na predição da carcinogenicidade de diferentes agentes?
7. Na ausência de se poder detectar diretamente um gene mutante em células cancerosas, que tipos de observações nos permitem inferir que o câncer é uma doença de células mutantes?

Leitura adicional

- Ames BN (1983) Dietary carcinogens and anticarcinogens. *Science* 231, 1256-1264.
- Bickers DR & Lowy DR (1989) Carcinogenesis: a fifty-year historical perspective *J. Invest. Dermatol.* 92, 121S-131S.
- Greenlee RT, Murray T, Bolden S & Wingo PA (2000) Cancer statistics 2000. *CA Cancer J. Clin.* 50, 7-33.
- Peto J (2001) Cancer epidemiology in the last century and the next decade. *Nature* 411, 390-395.
- Pisani P, Parkin DM, Bray F & Ferlay J (1999) Estimates of worldwide mortality from 25 cancers in 1990. *Int. J. Cancer* 83, 18-29.
- Preston-Martins S, Pike MC, Ross RK et al. (1990) Increased cell division as a cause of human cancer. *Cancer Res.* 50, 7415-7421.
- Wilson S, Jones L, Coussens C & Hanna K (eds.) (2002) *Cancer and the Environment: Gene-Environment Interaction*. Washington, DC: National Academy Press.



CAPÍTULO 3

Vírus Tumoraís

“Um tumor de galinha... tem sido propagado neste laboratório desde outubro de 1909. O comportamento desse novo crescimento tem sempre se assemelhado ao de um verdadeiro neoplasma, razão pela qual o fato de sua transmissão por meio de um filtrado livre de células assumir uma importância excepcional.”

Peyton Rous, biólogo em câncer, 1911

Vírus são capazes de causar uma grande variedade de doenças humanas, abrangendo desde raiva a varíola, ou mesmo um simples resfriado. A grande maioria desses agentes infecciosos age por meio da sua habilidade em multiplicar-se dentro de células hospedeiras infectadas, para matar essas células e liberar a progênie de partículas virais, que, por sua vez, passam a infectar outras células hospedeiras nas suas proximidades. Os efeitos **citopáticos** (morte celular) causados pelos vírus, junto com sua capacidade de rápida disseminação ao longo de um tecido, fazem com que esses agentes deixem um considerável rastro de destruição por onde passaram.

Mas as peculiaridades de certos ciclos de replicação viral podem, em determinadas ocasiões, traçar um rumo um tanto quanto diferente. Em vez de matar células infectadas, alguns vírus podem, paradoxalmente, forçar seus hospedeiros a vicejar, ou seja, a proliferar de forma descontrolada. Assim, esses vírus – geralmente denominados vírus tumorais – podem induzir câncer.

Em meados da década de 1970, vírus tumorais foram extensivamente estudados devido à suspeita de serem responsáveis por muitos dos tipos mais comuns de câncer em humanos. Tal noção não foi gerada por evidências acumuladas subsequente durante essa década, que indicavam que cânceres induzidos por vírus representavam apenas a minoria dos tipos de câncer que afligem a humanidade. No entanto, essa linha de pesquisa provou ser extremamente valiosa para biólogos em câncer: o estudo de uma série de vírus tumorais proveu o esclarecimento de muitos dos segredos há tempos obscuros sobre cânceres humanos, incluindo a grande maioria dos cânceres que não tem conexão alguma com infecções por vírus tumorais.

Como veremos, a pesquisa de vírus tumorais teve um histórico extremamente variável ao longo de seu curso no último século. Esses agentes infecciosos foram descobertos na primeira década do século XX e então retirados do foco central científico. Meio século depois, ressurgiu um interesse por eles, o que culminou no frenético ritmo científico envolvendo vírus tumorais observado na década de 1970.

O potencial dos vírus tumorais em causar câncer levou muitos pesquisadores a se questionarem como exatamente eles conseguiam desencadear a doença em seu hospedeiro. A maioria desses vírus possui genomas relativamente simples, contendo uma pequena carga de genes virais, que em alguns casos demonstram a capacidade de oprimir uma célula infectada e seu genoma infinitamente mais complexo, redirecionando o crescimento celular para uma nova direção. Tal comportamento indicou que vírus tumorais conseguiram desenvolver genes extremamente potentes, capazes de perturbar o complexo circuito regulador das células hospedeiras que eles infectaram.

Ao estudar vírus tumorais e seus mecanismos de ação, cientistas mudaram por completo a forma de avaliar a pesquisa em câncer. O câncer tornou-se uma doença de genes e, portanto, uma condição susceptível a análise a partir de ferramentas de biologia molecular e genética. Quando essa história começou, ninguém foi capaz de antecipar o quanto esses vírus tumorais obscuros iriam um dia revolucionar o estudo da patogenicidade do câncer em humanos.

3.1 Peyton Rous descobre um vírus do sarcoma em galinhas

Nas duas últimas décadas do século XIX, a pesquisa de Louis Pasteur e Robert Koch descobriu os agentes infecciosos que eram responsáveis por disenteria, cólera, raiva e uma série de outras doenças. Ao final do século, esses agentes haviam sido classificados em duas categorias distintas, em função de seu comportamento a partir da filtragem. As soluções contendo agentes infecciosos que ficassem contidas nos poros dos filtros eram consideradas como contendo bactérias. Os outros agentes, que eram pequenos o suficiente para atravessar os filtros, foram classificados como vírus. Baseando-se nesse critério, os agentes da raiva, da doença dos pés e boca e da varíola foram classificados como vírus.

O câncer também foi considerado um candidato à doença infecciosa. Já em 1876, um pesquisador na Rússia reportou a transmissão de um tumor de um cachorro a outro: pedaços de tecido tumoral do primeiro cachorro foram implantados no segundo, no qual surgiu um tumor algumas semanas mais tarde. Esse experimento foi comprovado por muito outros cientistas utilizando tumores de ratos e camundongos.

O significado desses primeiros experimentos permaneceu controverso. Alguns pesquisadores os interpretaram como provas concretas de que o câncer era uma doença transmissível. Outros preferiram dispensar esses experimentos de transplante, pois consideravam que tal trabalho mostrava apenas que tumores, assim como tecidos normais, poderiam ser excisados de um animal e forçados a crescer como um enxerto no corpo de um segundo animal.

Em 1908, dois pesquisadores em Copenhagem reportaram seu sucesso em extrair um agente filtrável de células leucêmicas de galinha e transmiti-lo a outras aves, que contraíram então a doença. Os dois dinamarqueses não conseguiram acompanhar o seu descobrimento inicial, o que levou Peyton Rous, que trabalhava no Instituto Rockefeller de Nova Iorque, a fundar a disciplina de virologia tumoral (Figura 3.1).

Em 1909, Rous começou a estudar um sarcoma que tinha aparecido no músculo peitoral de uma galinha. Nos experimentos iniciais, Rous conseguiu transmitir o tumor a partir da preparação de pequenos fragmentos tumorais, implantando-os em outras aves da mesma espécie. Posteriormente, com o objetivo de conduzir uma variação desse plano experimental, moeu um fragmento de sarcoma na areia e filtrou a mistura resultante (Figura 3.2). Quando injetou o filtrado resultante em aves jovens, elas também desenvolveram tumores, algumas



Figura 3.1 O jovem e o velho Peyton Rous. Peyton Rous começou seu trabalho em 1910, levando ao descobrimento do vírus do sarcoma de Rous (RSV). Mais de 50 anos depois (1966), recebeu o Prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia por esse trabalho – um tributo a sua persistência e longevidade. (Cortesia dos Arquivos da Universidade Rockefeller.)

vezes dentro de algumas semanas. Subseqüentemente, ele descobriu que esses tumores induzidos também poderiam ser homogeneizados para resultar, mais uma vez, em um agente infeccioso que poderia ser transmitido a outras aves, que também desenvolveriam sarcomas nos sítios de infusão.

Essas passagens seriais do agente indutor de sarcoma de um animal a outro levou a algumas conclusões que podem parecer óbvias atualmente, mas na época em que foram feitas eram nada menos do que revolucionárias. O agente carcinogênico, independentemente da natureza, era muito pequeno, visto que poderia atravessar um filtro. Portanto, tratava-se de um vírus (veja a Barra lateral 3.1), o qual poderia causar o aparecimento de um sarcoma em uma galinha injetada, em uma escala de tempo um tanto quanto previsível. Esse agente infeccioso poderia oferecer aos pesquisadores a oportunidade única de induzir câncer à vontade, em vez de basearem-se no aparecimento espontâneo e imprevisível de tumores em animais ou humanos. Além da sua habilidade em induzir câncer, esse agente, que passou a ser conhecido como vírus do sarcoma de Rous (RSV), era capaz de multiplicar-se nos tecidos da galinha; uma quantidade consideravelmente maior de vírus poderia ser obtida de um tecido tumoral infectado do que aquela que havia sido originalmente injetada.

Em 1911, quando Rous finalmente publicou seu trabalho, outro trabalho foi reportado envolvendo vírus transmissíveis em tumores de coelhos, denominados mixomas. Em seguida,

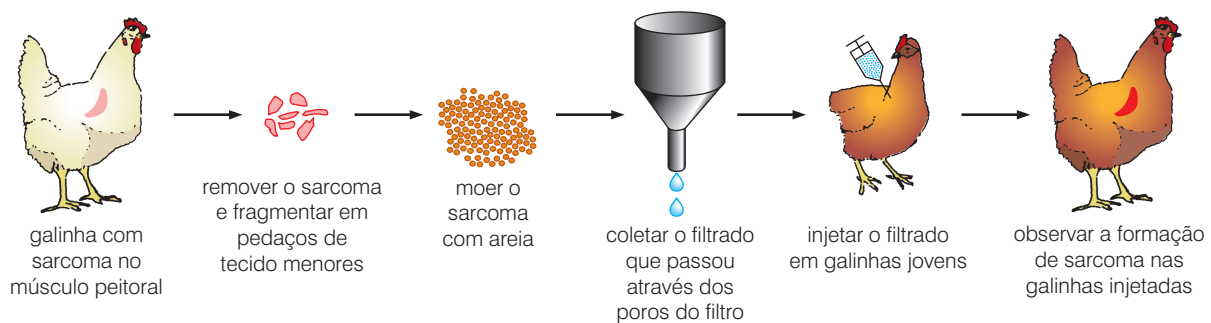


Figura 3.2 O protocolo de Rous para induzir sarcomas em galinhas. Rous removeu um sarcoma do músculo peitoral de uma galinha, moeu-o com areia e passou a mistura resultante através de um filtro poroso. Em seguida, injetou o filtrado (o líquido que passou pelo filtro) na asa de uma galinha jovem e observou o desenvolvimento de um sarcoma muitas semanas mais tarde. Posteriormente, moeu

esse novo sarcoma e repetiu o ciclo de homogeneização, filtração e injeção, observando, mais uma vez, a formação de tumor em outra galinha jovem. Esses ciclos poderiam ser repetidos indefinidamente; após uma repetição serial dessas passagens, o vírus era capaz de produzir sarcomas muito mais rapidamente do que o isolado viral original.

Barra lateral 3.1 Os vírus têm ciclos de vida simples O termo “vírus” refere-se a um espectro diversificado de partículas infecciosas que infectam e se multiplicam em uma ampla variedade de células, abrangendo desde bactérias a células de plantas e metazoários. Quanto às células que eles infectam, pode-se dizer que as partículas virais individuais, geralmente denominadas **virions**, são extremamente pequenas. Virions têm uma estrutura consideravelmente simples, apresentando um genoma de ácidos nucleicos (DNA ou RNA) enrolado em uma capa protéica (um **capsídeo**) e, em alguns casos, uma membrana lipídica ao redor do capsídeo. Ao serem isolados, os vírus são metabolicamente inertes. Eles conseguem multiplicar-se somente ao infectar e parasitar uma célula hospedeira adequada. O genoma viral, uma vez introduzido na célula, provê instruções para a síntese da progênie de partículas virais. A célula hospedeira, por sua vez, provê os precursores de baixo peso molecular necessários para a síntese de proteínas e ácidos nucleicos virais, a maquinaria de síntese protéica e, em muitos casos, as polimerases necessárias para a replicação e transcrição do genoma viral.

O encerramento do ciclo infeccioso resultante se dá pela produção de centenas, ou mesmo milhares, de partículas virais progenitoras que podem, então, sair da célula infectada e passar a infectar outras células suscetíveis. A interação do vírus com a célula hospedeira pode ser do tipo **virulenta**, em que a célula hospedeira é destruída durante o ciclo infeccioso, ou do tipo **temperado**, em que a célula hospedeira sobrevive por períodos extensos, ao longo dos quais abriga o genoma viral e libera partículas virais progenitoras.

Muitos vírus do tipo DNA dupla fita (dsDNA) fazem sua replicação de uma maneira relativamente semelhante ao metabolismo macromolecular da célula hospedeira (Figura 3.3). Isso permite que tais vírus utilizem-se das DNA polimerases da célula hospedeira para replicarem seu DNA, das RNA polimerases para transcrever os mRNAs virais a partir de moldes dsDNAs virais e dos ribossomos para traduzir os mRNAs virais. Uma vez sintetizadas, as proteínas virais são utilizadas para encapar (colocar dentro de um capsídeo) os genomas virais recém-sintetizados, resultando na formação de uma progênie completa de virions, que são então liberados da célula infectada.

Uma vez que as células não expressam enzimas que possam replicar moléculas de RNA, muitas partículas virais contendo RNA codificam suas próprias RNA polimerases RNA-dependentes para replicar seus genomas. Como exemplo disso, o poliovírus produz tal enzima, assim como o vírus da raiva. Como veremos posteriormente neste capítulo,

os vírus tumorais de RNA, como o vírus do sarcoma de Rous, seguem uma rota muito mais complexa para replicar seu RNA viral.

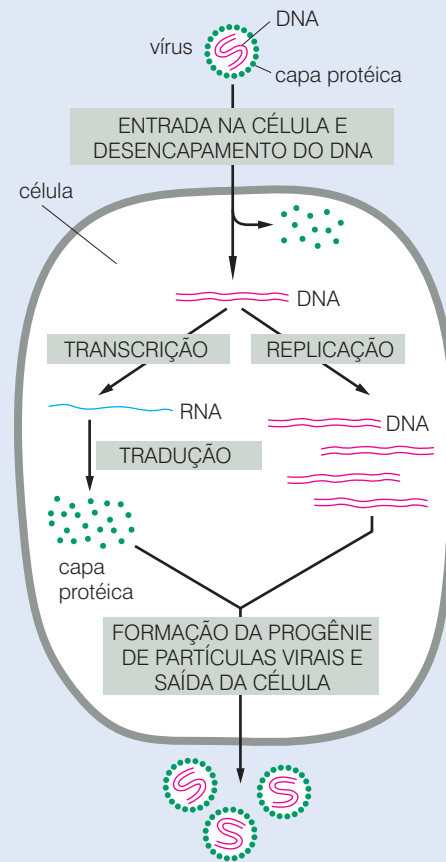


Figura 3.3 Ciclo de vida de vírus com genomas dsDNA O ciclo de vida dos vírus com genomas de DNA dupla fita se assemelha consideravelmente ao das células hospedeiras. Praticamente todas as etapas sintéticas que levam à produção de DNA, RNA e proteínas virais podem ser realizadas a partir da utilização da maquinaria de síntese provida pela célula hospedeira infectada. (De B. Alberts et al., *Molecular Biology of the Cell*, 4th ed. New York: Garland Science, 2002.)

Rous e seus colaboradores encontraram outros dois vírus de galinha, e mais um vírus do sarcoma em galinha foi reportado por outros cientistas no Japão. Apesar dessas descobertas, o que se sucedeu foi um completo silêncio pelas duas décadas seguintes, até que novos vírus tumorais foram descobertos. A natureza molecular dos vírus e a forma pela qual eles se multiplicavam permaneceram um mistério por mais de meio século após a descoberta inicial de Rous.

Além disso, o seu descobrimento sobre o vírus do sarcoma reforçou as convicções daqueles que acreditavam que virtualmente todas as doenças humanas eram provocadas por agentes infecciosos. Na sua visão, o câncer poderia ser adicionado à cada vez mais longa lista de doenças como cólera, tuberculose, raiva e sepse, cujas causas podiam ser associadas a um agente microbiano específico. Por 1913, o dinamarquês Johannes Gribb Fibiger reportou que cânceres estomacais em ratos poderiam ser rastreados por vermes espiroquetos que eles abrigavam. Seu trabalho, para o qual ele recebeu o Prêmio Nobel de 1926, representava uma direta e forte validação da idéia primeiramente indicada pelo trabalho de Rous, que alegava que o câncer era mais um exemplo de uma doença infecciosa.

Alguns meses após o Prêmio Nobel de Fibiger em 1926, ele veio a falecer, e seu trabalho científico começou a se desintegrar. Os tumores estomacais que ele descrevera na verdade nada tinham a ver com tumores. Descobriu-se que constituíam epitélio estomacal metaplásico. Essas lesões estavam presentes no estômago de ratos devido às profundas deficiências de vitamina sofridas por estes animais; eles habitavam refinarias de açúcar, onde ingeriam quase que exclusivamente cana-de-açúcar. O Prêmio Nobel de Fibiger passou a ser considerado motivo de vergonha dentro da, ainda pequena, comunidade de pesquisadores em câncer. Sua idéia foi logo abandonada, levando descrédito ao seu trabalho e à noção de que o câncer poderia ser causado por agentes infecciosos.

O interesse nas possíveis origens do câncer foi deslocado quase que totalmente a cânceres induzidos quimicamente. Uma série de compostos químicos foi descoberta no início do século XX com propriedades carcinogênicas evidentes (veja a Seção 2.8). O estudo do vírus do sarcoma de Rous, assim como os outros vírus tumorais, foram então deixados de lado por algumas décadas.

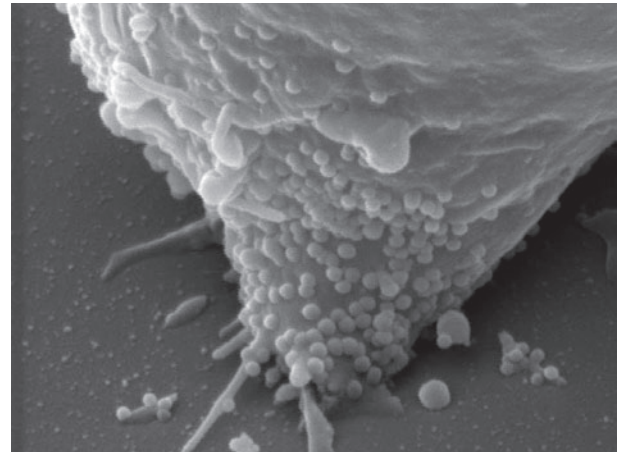
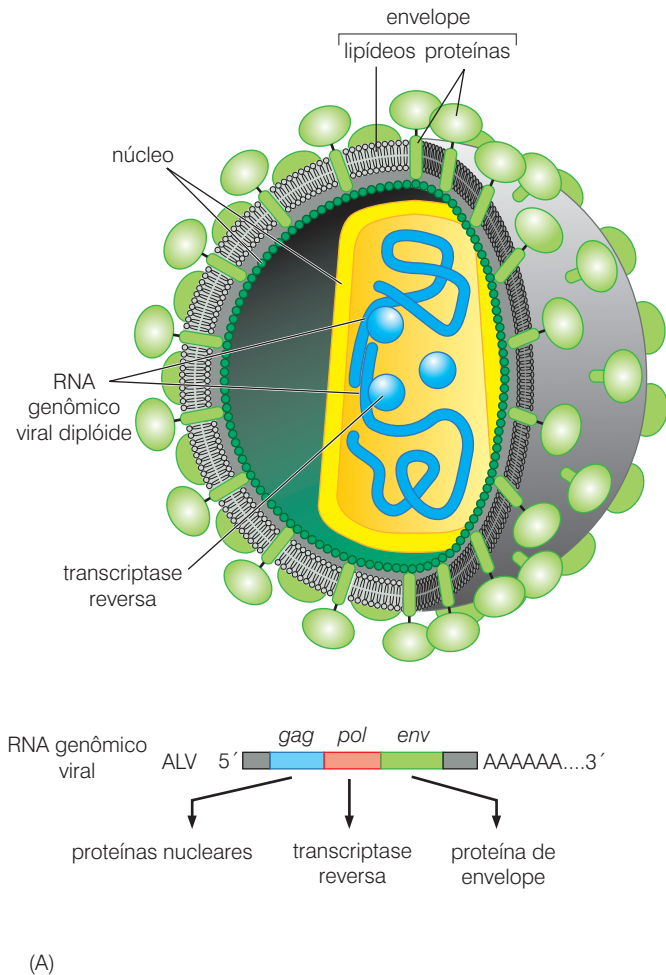
3.2 A descoberta de que o vírus do sarcoma de Rous tem a capacidade de transformar células infectadas em cultura

O renascimento da pesquisa envolvendo o vírus do sarcoma de Rous ocorreu basicamente no *Institut of Technology* da Califórnia, em Pasadena, no laboratório do professor Renato Dulbecco. O colega de pós-doutorado de Dulbecco, Harry Rubin, descobriu que quando estoques de RSV eram introduzidos em placas de Petri contendo culturas de fibroblastos de embrião de galinha (CEFs), as células infectadas por RSV sobreviviam, aparentemente de maneira indefinida. Parecia que RSV parasitava essas células, forçando-as a produzir uma constante carga de partículas virais progenitoras por muitos dias, semanas e até mesmo meses (Figura 3.4). A maioria dos outros vírus, em contraposição, era conhecida por invadir células hospedeiras, multiplicar-se e matar rapidamente seus hospedeiros; a grande quantidade de partículas virais progenitoras liberadas a partir das células que estavam morrendo poderiam então passar a infectar outras células suscetíveis nas proximidades, repetindo o ciclo de infecção, multiplicação e destruição celular.

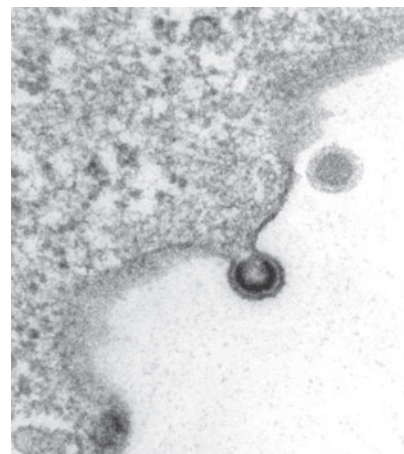
Cabe ressaltar que as células infectadas por RSV nessas culturas apresentavam muitos dos traços que haviam sido previamente associados a células cancerosas. Portanto, uma vez tendo aplicado partículas de RSV em fibroblasto de galinha em uma cultura em placa, surgiram **focos** (agrupamentos) de células infectadas. Vistas ao microscópio, essas células se assemelhavam consideravelmente às células isoladas de sarcomas de galinha (Figura 3.5). Dessa forma, apresentavam uma **morfologia** (formato, forma) arredondada e um metabolismo levemente semelhante àquele observado em células isoladas de tumores. Tal semelhança levou Rubin, Howard Temin (um estudante do laboratório de Dulbecco; Figura 3.6) e outros a concluir que o processo de **transformação** celular – conversão de uma célula normal em uma célula tumoral – poderia ser realizado dentro dos limites de uma placa de Petri, e não apenas no ambiente de tecido vivo, que é complexo e difícil de ser estudado.

Essas simples observações mudaram radicalmente o curso da pesquisa envolvendo câncer no século XX, visto que demonstravam claramente que a formação do câncer poderia ser estudada ao nível de células individuais, cujo comportamento poderia ser acompanhado de perto sob o microscópio. Essa percepção sugeria a possibilidade de que toda a complexidade biológica dos tumores poderia um dia ser compreendida a partir do estudo de células transformadas que formavam massas tumorais. Assim, um número cada vez maior de biólogos começou a tratar o câncer como uma doença relacionada a células defeituosas em vez de tecidos em desenvolvimento anormal.

Temin e Rubin, logo seguidos por muitos outros, utilizaram o modelo experimental para aprender alguns princípios básicos sobre transformação celular. Eles estavam interessados no destino de uma célula que foi inicialmente infectada por RSV. Como essa célula se proliferava quando comparada com células vizinhas não-infectadas? Após a exposição de células a



(B)



(C)

Figura 3.4 O virion do RSV e vírus relacionados (A) Este desenho esquemático da estrutura de um *virion retroviral*, como o do vírus do sarcoma de Rous, indica a existência de três tipos principais de proteínas virais. Os espinhos glicoprotéicos (codificados pelo gene viral *env*) protraem da bicamada lipídica que circunda o virion; eles possibilitam ao virion *adsorver-se* (grudar-se) na superfície celular e introduzir seu conteúdo interno no citoplasma da célula. O conteúdo consiste em uma complexa capa protéica formada pelas várias proteínas nucleares codificadas pelo gene viral *gag*. Dentro desse invólucro protéico, estão presentes duas cópias idênticas do RNA genômico viral e uma quantidade razoável de moléculas de

transcriptase reversa especificadas pelo gene viral *pol*. (B) Micrografia eletrônica de varredura e (C) micrografia eletrônica de transmissão evidenciando partículas do vírus da leucemia murina (MLV) brotando da superfície de uma célula infectada. À medida que os nucleocapsídeos (contendo as proteínas *gag*, o RNA do virion e a transcriptase reversa) abandonam a célula, eles se embrulham com um pedaço da bicamada lipídica tomada da membrana plasmática da célula infectada. (A, adaptada de H. Fan et al., *The Biology of AIDS*. Boston, MA: Jones and Barlett Publishers, 1989; B, cortesia do Albert Einstein College of Medicine; C, cortesia do Laboratoire de Biologie Moleculaire.)

uma solução de partículas virais (geralmente denominada **estoque viral**), esses dois pesquisadores depositariam uma camada de agar sobre a camada de células em crescimento no fundo da placa de Petri, prevenindo, assim, que partículas virais se disseminassem de células recém-infectadas para células não-infectadas em outras partes da placa. Portanto, qualquer alteração no crescimento celular seria um resultado direto da infecção inicial por partículas virais de fibroblastos de embrião de galinha.

Os focos que Temin e Rubin estudaram revelaram as dramáticas diferenças no comportamento de células normais em relação a células transformadas. Quando introduzidas em uma placa de Petri, as células normais formavam ilhas espalhadas ao longo do fundo da placa. Elas, então, proliferavam-se e finalmente preenchiam todo o espaço existente no fundo da placa, criando culturas **confluentes**. Entretanto, uma vez tendo havido confluência, essas células normais interrompiam sua proliferação, resultando em uma camada única de células (ou levemente mais espessa), em geral denominada **monocamada** celular (Figura 3.7).

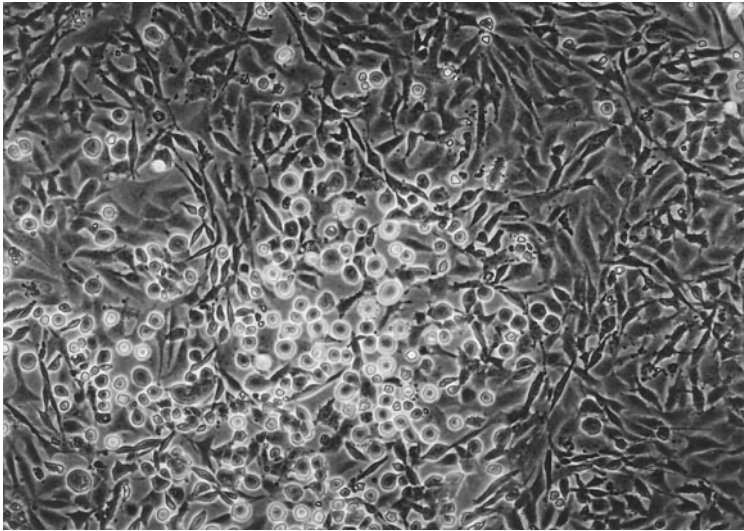


Figura 3.5 Um foco induzido por RSV Este microscópio de contraste de fase revela um foco de fibroblastos de embrião de galinha transformado com vírus do sarcoma de Rous circundado por uma monocamada de células não-infectadas. O foco se destaca devido ao fato de ser formado por camadas múltiplas de células e pela morfologia arredondada das células transformadas e sua refratibilidade, que contrasta com a morfologia achatada das células normais. (Cortesia de PK. Vogt.)

A interrupção do crescimento dessas células normais após a formação de monocamadas confluentes é resultante de um processo que passou a ser conhecido como **inibição por contato**, **inibição por densidade** ou **topoinibição**. De alguma forma, uma alta densidade celular ou contato com células vizinhas fazia com que essas células parassem de se dividir. Esse comportamento, observado em células normais, se mostrou consideravelmente contrastante com aquele observado em **transformantes** dentro dos focos induzidos por RSV, as quais haviam claramente perdido a inibição por contato (densidade) e, como conseqüência, continuavam a proliferação, literalmente empilhando-se umas sobre as outras e criando uma massa celular compacta com multicamadas tão grossa que podia geralmente ser visualizada.

Sob certas condições experimentais, poderia ser demonstrado que todas as células de um dado foco eram descendentes de uma única célula progenitora que havia sido infectada e, presumivelmente, transformada por uma partícula de RSV. Atualmente, esse tipo de célula descendente seria conhecido como clone celular, e o foco, como um todo, um crescimento clonal, de forma que, em ambos os casos, os descendente de tais células provêm de um progenitor comum.

O comportamento desses focos deu suporte a uma especulação sobre as possíveis similaridades entre a transformação celular desencadeada por RSV na placa de Petri e o processo que levou ao aparecimento de tumores em animais vivos, inclusive no ser humano: é possível que todas as células de uma massa tumoral humana em crescimento espontâneo também constituam um crescimento clonal e, portanto, sejam descendentes de uma única célula progenitora comum que, de alguma forma, passou por uma transformação e então iniciou um programa de replicação, o qual finalmente deu origem a milhões ou mesmo bilhões de células descendentes, que, juntas, formaram a massa. Como foi discutido anteriormente (veja a Seção 2.5), análises genéticas detalhadas de células tumorais humanas acabaram sendo necessárias para testar essa noção de forma definitiva.

3.3 A presença contínua de RSV é necessária para manter a transformação

O comportamento das células de um foco induzido por RSV indicava que o fenótipo transformante era transmitido de uma célula de galinha recém-infectada e transformada para seus descendentes diretos. Essa transmissão levantou uma outra série de questões: será que uma partícula de RSV infecta e transforma a célula progenitora do foco e, posteriormente, continua a influenciar o comportamento de todos seus descendentes diretos, garantindo também que eles continuassem transformados? Ou, como alternativa, será que RSV age da forma “bate-e-corre”, por golpear a célula progenitora recém-infectada, alterando o seu comporta-

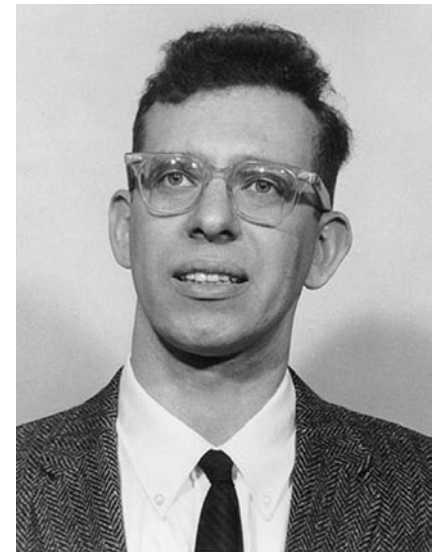


Figura 3.6 Howard Temin Howard Temin, retratado acima em 1964, iniciou seu trabalho demonstrando a habilidade do vírus do sarcoma de Rous em transformar células *in vitro* e evidenciou a persistência do vírus em células infectadas e transformadas. Ele postulou a existência de um pró-vírus de DNA e, subseqüentemente, compartilhou o Prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia de 1975 com David Baltimore por seus simultâneos descobrimentos envolvendo a enzima transcriptase reversa. (Cortesia dos Arquivos da Universidade de Wisconsin.)

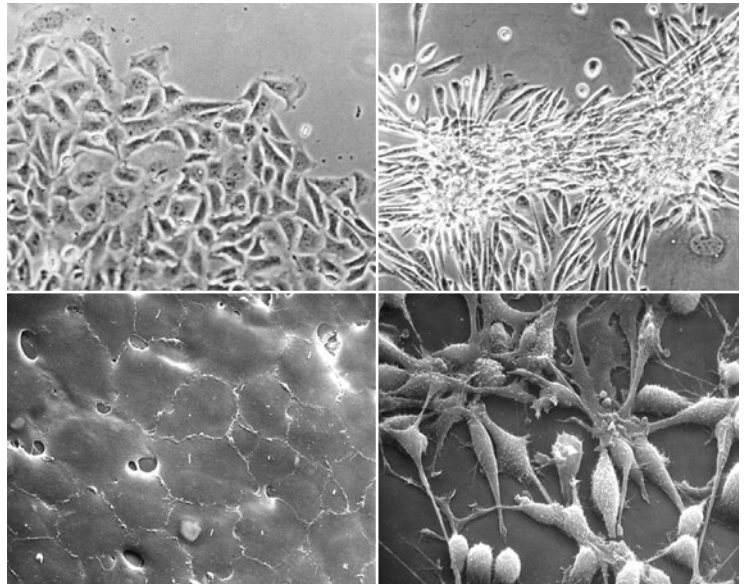
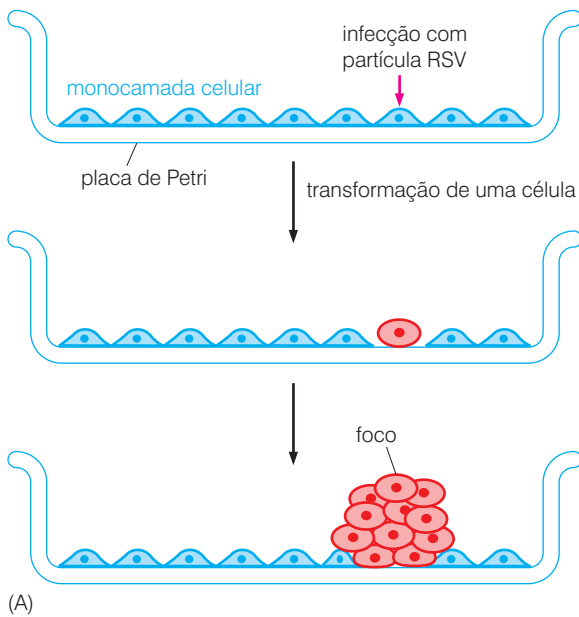


Figura 3.7 Células transformadas formando focos (A) Fibroblastos normais de embrião de galinha (azul) crescendo no fundo da placa de Petri formam uma camada única de células – uma monocamada. Isso se deve ao fato de, ao ocorrer o contato entre elas, a proliferação é interrompida – o comportamento chamado de “inibição por contato”. Entretanto, quando uma dessas células é infectada por RSV, ela (vermelha) e seus descendentes adquirem uma morfologia arredondada e perdem a inibição por contato. Como consequência, elas continuam a proliferação apesar de tocarem umas nas outras e, finalmente, acumulam-se umas sobre as outras (um foco) formando uma grossa massa celular que pode ser identificada visualmente. (B) Os efeitos da infecção e transformação por RSV podem ser observados tanto por microscopia de contraste de fase (quadros superiores) como por microscopia eletrônica de varredura (quadros inferiores). Fibroblastos normais de embrião de galinha estão dispersos de forma a compor um padrão de monocamada contínuo (quadros à esquerda). Entretanto, após a transformação por RSV, eles ficam mais arredondados, tornam-se refráteis (halos brancos, quadro superior direito) e empilham-se uns sobre os outros (quadros à direita). (B, cortesia de L.B. Chen.)

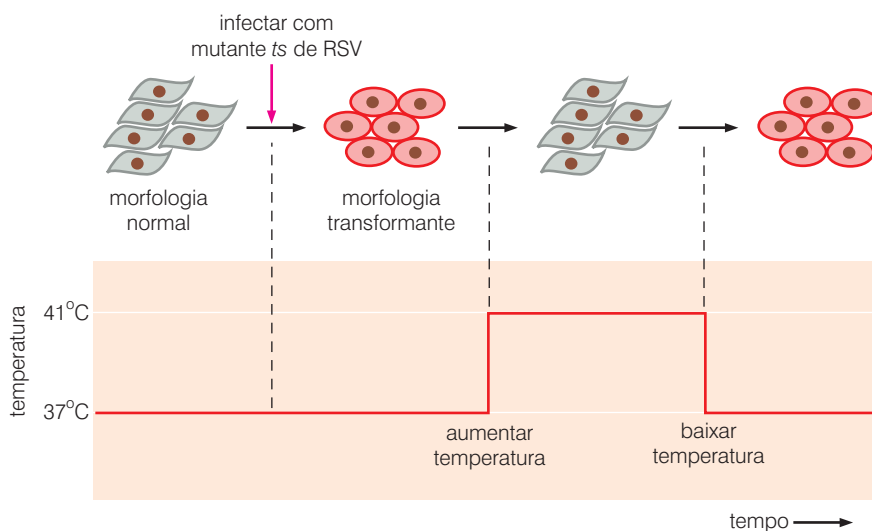
mento e então abandonando a “cena do crime”? De acordo com este segundo cenário, a célula progenitora poderia, de alguma forma, transmitir o fenótipo de crescimento cancerígeno a seus descendentes sem a presença contínua de RSV.

O trabalho de Temin e Rubin evidenciou que os descendentes de uma célula infectada por RSV continuavam a abrigar cópias do genoma de RSV, mas tal evidência, por si própria, resolveu pouco. A verdadeira questão era: o estado transformante das células descendentes realmente *depende* de alguma influência contínua exercida pelos genomas de RSV que elas abrigavam?

Um experimento conduzido em 1970 na Universidade da Califórnia, Berkeley, resolveu essa questão de forma clara. Foi desenvolvido um mutante de RSV capaz de transformar células de galinha quando estas eram cultivadas à 37°C em vez de 41°C (que é a temperatura geralmente utilizada no crescimento de células de galinha). Mutantes **sensíveis à temperatura** (*ts*) como este eram conhecidos por codificar proteínas parcialmente defectivas, que retêm sua estrutura e função normal a uma temperatura e perdem sua função em outra temperatura, presumivelmente pela **desnaturação** térmica da estrutura da proteína mutante.

Após os fibroblastos de embrião de galinha terem sido infectados com o mutante *ts* de RSV, essas células tornavam-se transformadas ao passarem por um subsequente cultivo na temperatura mais baixa (**permissiva**) de 37°C, como foi dito anteriormente. De fato, essas células poderiam ser propagadas por muitas gerações celulares na temperatura mais baixa e continuar a crescer e se dividir da mesma forma que células cancerígenas, demonstrando sua característica morfológica transformante (veja a Figura 3.7B). Mas, semanas mais tarde, se a temperatura dessas culturas infectadas fosse aumentada para 41°C (temperatura **não-permissiva**), essas células perdiam seu aspecto transformante e rapidamente reverteriam a forma e o padrão de crescimento de células que jamais haviam sido infectadas por RSV (Figura 3.8).

Os experimentos de Berkeley possibilitaram chegar a conclusões, ainda que simples, consideravelmente importantes. Uma vez que as células que descendiam de uma célula *ts* infectada por RSV continuavam apresentando o característico crescimento sensível à temperatura, parecia óbvio que cópias do genoma do vírus infectante persistiam nelas por semanas após a infecção inicial. Essas cópias do genoma de RSV nas células descendentes continuavam a produzir algumas proteínas sensíveis à temperatura (cuja identidade não era precisamente conhecida). O mais importante: as **ações contínuas** de tal proteína eram necessárias para manter o fenótipo de crescimento transformante das células infectadas por RSV.



Esse trabalho demonstrou que a transformação celular, ao menos aquela induzida por RSV, não era uma relação do tipo bate-e-corre. Utilizando os termos de virologistas tumorais, o gene transformante viral era necessário tanto para *iniciar* quanto para *manter* o fenótipo transformante de células infectadas por vírus.

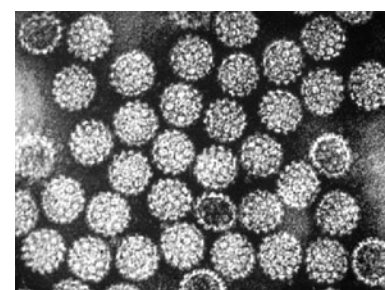
3.4 Vírus contendo moléculas de DNA também são capazes de induzir câncer

O RSV era apenas um de um grupo muito diferente de vírus que eram capazes de induzir tumores em animais infectados. Por 1960, outras quatro classes de vírus tumorais haviam igualmente tornado-se agentes atrativos para estudos por biólogos em câncer. Um novo tipo de vírus tumoral foi descoberto quase um quarto de século após o trabalho pioneiro de Rous. Esse vírus, descoberto por Richard Shope em coelhos, causava **papilomas** (verrugas) na pele. Estas eram lesões benignas que, em raras ocasiões, progrediam a tumores verdadeiros – carcinomas de células escamosas da pele.

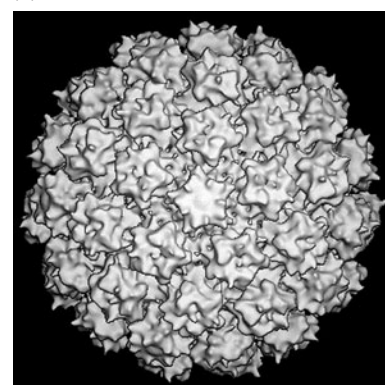
Ao final da década de 1950, tornou-se claro que o vírus de Shope havia sido construído de forma bem diferente do RSV. As partículas de papilomavírus portavam genomas de DNA, enquanto as partículas de RSV eram conhecidas por portar moléculas de RNA. Além disso, as partículas do vírus de Shope eram envoltas apenas por uma capa protéica, ao passo que o RSV tinha também claramente uma membrana lipídica por fora. Nas décadas que se sucederam, mais de 100 diferentes tipos de papilomavírus humanos (HPV) seriam descobertos, sendo todos relacionados ao vírus de Shope (Figura 3.9).

A pesquisa iniciada nos anos 1930 em Bar Harbor, Maine, gerou, três décadas mais tarde, o agente (vírus de tumor mamário de camundongo, MMTV) que era responsável pela transmissão, de mãe para prole, através do leite, da suscetibilidade ao câncer de mama em certas linhagens de camundongos. Foi observado que o genoma de MMTV, assim como o de RSV, é composto de moléculas de RNA e, portanto era um tanto quanto diferente do genoma de papilomavírus.

Figura 3.8 Mutante sensível à temperatura e manutenção da transformação por RSV. Quando fibroblastos de embrião de galinha eram infectados na temperatura *permissiva* (37°C), na qual a função transformante viral pode ser expressa, as células tornavam-se transformadas. Quando as culturas contendo essas células infectadas eram deslocadas para a temperatura *não-permissiva* (41°C), a função transformante viral era inativada, e as células eram revertidas a uma morfologia normal, não transformante. Posteriormente, quando a temperatura da cultura era trocada novamente à temperatura permissiva, a função transformante viral era recuperada, e as células voltavam, mais uma vez, a exibir uma morfologia transformante. A perda do fenótipo transformante em função do aumento da temperatura demonstrou que a ação contínua de alguma proteína viral sensível à temperatura era necessária para manter esse fenótipo. A reaquisição do fenótipo transformante após o decréscimo da temperatura indicava que o genoma viral continuava a estar presente nessas células na temperatura alta independentemente de sua aparência normal.



(A)



(B)

Figura 3.9 Papilomavírus de Shope (A) Micrografia eletrônica do papilomavírus de Shope. (B) Esta micrografia crio-eletrônica, juntamente com um aumento da imagem, revela a estrutura de uma partícula do papilomavírus humano. (A, cortesia de D. DiMaio; B, de B.L. Trus et al., *Nat. Struct. Biol.* 4: 413-420, 1997.)

Tabela 3.1 Genomas de vírus tumorais

	Família viral	Tamanho aproximado do genoma (kb)
<i>Vírus de DNA</i>		
Vírus da hepatite B (HBV)	hepadna	3
SV40/polioma	papova	5
Papiloma humano 16 (HPV)	papova	8
Adenovírus humano 5	adenovírus	35
Herpesvírus humano 8 (HSV-8; KSHV)	herpesvírus	165
Vírus de fibroma de Shope	poxvírus	160
<i>Vírus de RNA</i>		
Vírus do sarcoma de Rous (RSV)	retrovírus	9
Vírus da leucemia humana de células T (HTLV-I)	retrovírus	9

Adaptada, em parte, de G.M. Cooper, *Oncogenes*, 2nd ed. Boston: Jones and Bartlett Publishers, 1995.

Nos anos 1950 e 1960, uma série de outros vírus tumorais de DNA foram descobertos (Tabela 3.1). O poliomavírus, assim denominado em função da sua habilidade em induzir uma distinta variedade de tipos de tumores em camundongos, foi descoberto em 1953. O vírus SV40 é consideravelmente similar ao poliomavírus tanto em tamanho quanto em constituição química (o 40º vírus símio em uma série de isolados). Esse vírus de macaco foi originalmente descoberto como sendo um contaminante presente nos estoques de vacina para poliovírus preparados na metade e final dos anos 1950 (Figura 3.10A). Minuciosas investigações virológicas revelaram que partículas de SV40 estavam geralmente “escondidas” em culturas celulares de rim de macacos *rhesus* e *cynomolgus* utilizados para propagar poliovírus durante a preparação de vacina. Na verdade, a presença de SV40 não era inicialmente perceptível nessas culturas celulares. Entretanto, quando os estoques de poliovírus que haviam sido propagados nessas células de macaco eram posteriormente utilizados para infectar células de rim de macaco verde africano (AGMK), SV40 revelou-se por induzir um efeito citopático muito distinto – inúmeros **vacúolos** grandes (estruturas em forma de bolha preenchidas por fluido) no citoplasma de células infectadas (Figura 3.10B). Um dia após a forma-

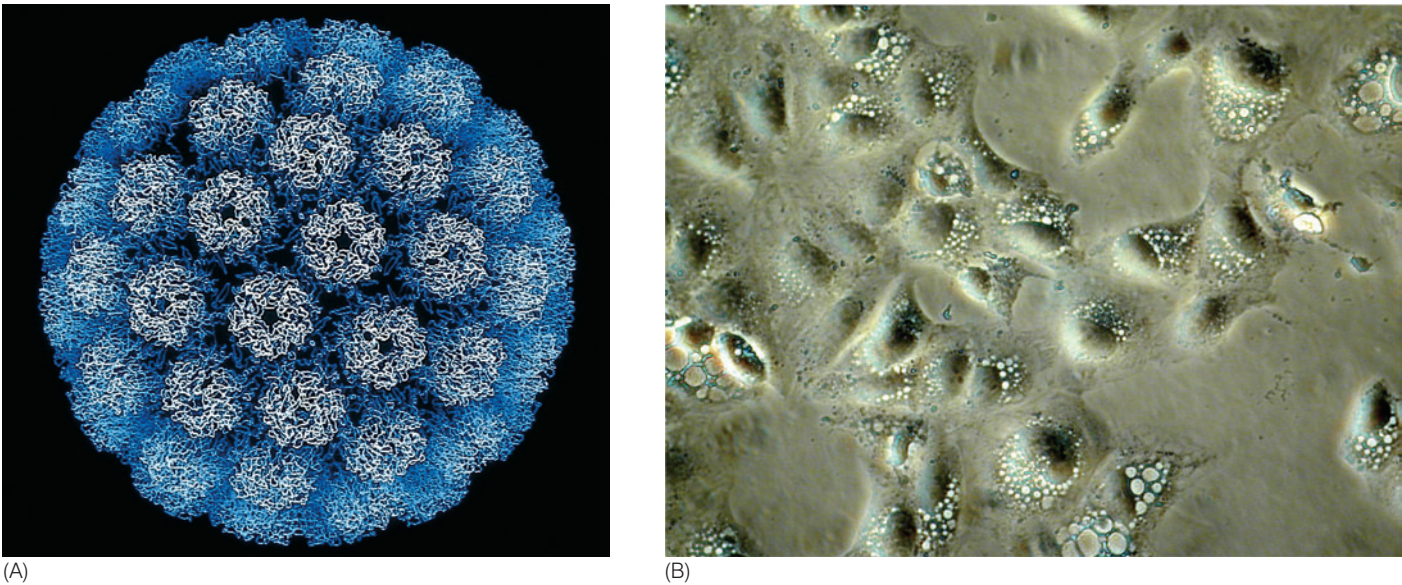


Figura 3.10 Vírus SV40 (A) Como determinado por difração de raios X, o capsídeo protéico do vírus tumoral de DNA SV40 consiste em três proteínas codificadas pelo vírus que estão agrupadas formando pentâmeros e hexâmeros com simetria icosaédrica. O genoma dsDNA de SV40 está abrigado dentro desse capsídeo. (B) SV40 força um ciclo lítico em células hospedeiras permissivas, como células de rim de uma

série de espécies de macaco. O efeito citopático resultante aqui observado envolve a formação de grandes vacúolos citoplasmáticos um pouco antes da morte e liberação de dezenas de milhares de partículas virais progenitoras. (A, cortesia de Robert Grant, Stephen Crainic e James M. Hogle; B, de A. Gordon-Shaag et al., *J. Virol.* 77: 4273-4282, 2003.)

ção dos vacúolos nas células infectadas por SV40, elas se romperiam, liberando dezenas de milhares de partículas virais progenitoras. (Devido à contaminação por SV40 durante o curso de produção de vacina para poliovírus, algumas culturas celulares infectadas por poliovírus produziam muito mais partículas virais de SV40 do que de poliovírus!)

Esse **ciclo lítico** de SV40 contrastou fortemente com seu comportamento em células preparadas a partir de embriões de camundongo, rato ou hamster. SV40 não se mostrou capaz de replicar nessas células, que foram então consideradas como sendo hospedeiras *não-permissivas*. Mas, na ocasião, em uma célula dentre milhares em uma população infectada, se desenvolveu um transformante que compartilhava muitas de suas características com as de células transformadas por RSV, ou seja, uma célula que passou por mudanças morfológicas e perdeu a inibição por contato, e adquiriu a habilidade de formar tumores *in vivo*. Em função disso, SV40 foi classificado como um vírus tumoral.

Estimativas indicam que entre um e dois terços das vacinas para pólio – a vacina viva Sabin, oral, e a vacina inativada Salk, injetável – administradas entre 1955 e 1963 continham o vírus SV40 como um contaminante, e entre 10 e 30 milhões de pessoas foram expostas a esse vírus por meio de vacinação. Em 1960, temia-se que o contaminante SV40 pudesse desencadear câncer em muitos daqueles que foram vacinados; de modo tranquilizador, análises epidemiológicas conduzidas durante as quatro décadas seguintes indicaram um pequeno, se existente, risco aumentado de câncer entre aqueles expostos a essas duas vacinas (Barra lateral 3.2).

O papilomavírus de Shope, o poliomavírus de camundongo e SV40 foram juntamente agrupados na classe dos **papovírus** de vírus tumorais de DNA, termo que se refere a *papiloma*, *polioma* e os *vacúolos* induzidos por SV40 durante sua infecção lítica. Pela metade dos anos 1960, estava evidente que os genomas dos papovírus eram todos formados por moléculas de DNA dupla fita circular (Figura 3.11). Isso revelou-se consideravelmente conveniente para experimentadores, visto que existiam diversas técnicas em uso na época que conseguiam separar essas moléculas circulares de DNA relativamente pequenas (cerca de 5 a 8 quilobases [kb] de comprimento) das moléculas de DNA lineares muito maiores presentes nos cromossomos das células hospedeiras infectadas.

Barra lateral 3.2 Será SV40 responsável pela peste mesoteliomal? O mesotélio é a membrana externa que reveste vários órgãos internos e deriva-se diretamente do mesoderma embrionário. Mesoteliomas – tumores de diversas superfícies mesoteliais – eram virtualmente desconhecidos nos Estados Unidos na primeira metade do século XX. Entretanto, a partir de 1960, sua incidência começou a aumentar vertiginosamente. No final do século, a incidência anual havia chegado perto dos 2.500 nos Estados Unidos. Muito desse aumento na incidência tem sido atribuído à exposição ao asbesto, mais especificamente um subtipo denominado crocidolito. Portanto, a doença é freqüentemente observada entre indivíduos que trabalharam com asbesto, que era utilizado como material isolante de resistência ao calor até ser finalmente banido do mercado nas duas últimas décadas do século. Entretanto, 20% dos pacientes com mesotelioma não têm exposição comprovada ao asbesto, fato que provocou a busca por outros agentes etiológicos (causadores).

SV40 é um agente etiológico plausível de mesotelioma. Até 2003, 41 laboratórios mundo afora já haviam reportado a presença de DNA, RNA ou proteínas de SV40 em células de mesotelioma. Em geral, vestígios do vírus são raramente encontrados em tumores humanos, com exceção a certos tipos de tumores cerebrais. Uma cultura de células de mesotelioma humano pode ser facilmente infectada por SV40, e essa infecção as leva a uma imediata **imortalização**, ou seja, à habilidade dessas células, que normalmente têm um potencial de proliferação limitado em cultura, a multiplicarem-se indefinidamente.

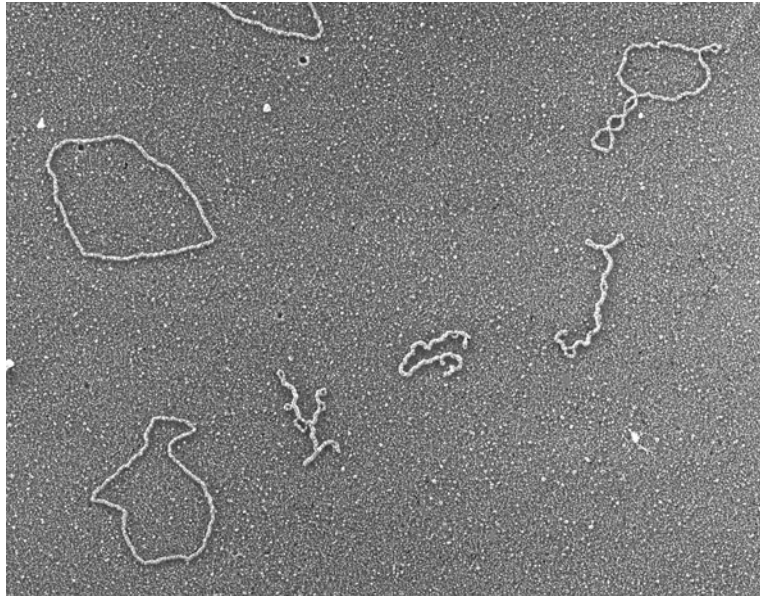
A presença da contaminação por SV40 nas vacinas estoque de poliovírus trouxe à tona questionamentos quanto ao mesotelioma ter sido induzido em muitos indivíduos como um efeito colateral não pretendido pela vacinação para poliovírus. Na verdade, podem existir muitos tipos de mesoteliomas em indivíduos que dificilmente tenham sido expostos a essas vacinas. Além disso, a proteína antígeno-T viral, cuja presença é invariavelmente observada em células transformadas por SV40 (veja a Seção 3.6) é raramente detectada em tumores

mesoteliomais. Ainda, tentativas em demonstrar DNA viral têm geralmente revelado segmentos de DNA que são indicativos de artefatos laboratoriais, como contaminação de amostras de tumores mesoteliomais por estoques de SV40 ou por plasmídeos recombinantes de DNA laboratoriais que haviam sido previamente construídas para incluir segmentos do genoma viral. A descoberta de tais contaminações provê mais argumentos para aqueles que não acreditam na ação patogênica de SV40 em mesoteliomas.

Sabe-se que até 85% dos humanos estão infectados com dois vírus que estão intimamente aparentados com SV40 – JC e BK –, e o antissor que reconhece os capsídeos desses vírus tem reação cruzada com o capsídeo de SV40, explicando várias declarações de que o SV40 está geralmente presente nos tecidos humanos. Em indivíduos imunodeprimidos, principalmente pacientes com AIDS, o vírus JC pode causar uma degeneração cerebral fatal – leucoencefalopatia multifocal progressiva (PML) –, mas não há evidências de que seja também carcinogênico.

Figura 3.11 Genomas de papovavírus

Análises de microscopia eletrônica revelaram a estrutura de genomas de DNA de papovavírus, incluindo a do genoma de SV40, aqui apresentada, como sendo dupla fita e circular. Na figura, estão apresentados o DNA de SV40 na forma circular-fechada superenrolada (forma I; DNAs enroscados) e a forma circular relaxada (forma II; círculos abertos e largos). A forma III, que é uma forma linear do DNA viral resultante de uma quebra no DNA dupla fita, não está apresentada. (Cortesia de J.D. Griffith.)



O grupo de vírus tumorais de DNA aumentou ainda mais com o descobrimento de que o adenovírus humano, sabidamente responsável por infecções respiratórias superiores em humanos, era capaz de induzir tumores em hamsters infectados. Aqui se estabelecia um impressionante paralelo com o comportamento de SV40. Os dois vírus podiam multiplicar-se livremente em suas células hospedeiras naturais, que eram, portanto, consideradas como sendo permissivas. Durante os ciclos líticos virais resultantes, células hospedeiras permissivas eram rapidamente mortas em sincronia com a liberação da progênie de partículas virais. Mas, quando introduzidos em células não-permissivas, tanto adenovírus como SV40 falharam em replicar-se, deixando para trás, ainda que em uma frequência muito baixa, clones de transformantes.

Outros participantes da classe de vírus tumorais de DNA eram membros do grupo dos herpesvírus. Enquanto herpesvírus humano dos tipos 1 e 2 aparentemente não eram **tumorogênicos** (capazes de induzir tumor), um herpesvírus distantemente relacionado oriundo de macacos *Saimiri* provocou linfomas rapidamente e de forma fatal quando injetados em macacos de diversas outras espécies. Outro membro distantemente relacionado da família dos herpesvírus – vírus Epstein-Barr (EBV) – foi caracterizado por estar intimamente relacionado com o desenvolvimento de linfomas de Burkitt em crianças jovens da África equatorial e da Nova Guiné, assim como carcinomas nasofaríngeais no sudeste da Ásia. Finalmente, pelo menos dois membros da classe dos poxvírus, que inclui o vírus *smallpox*, foram identificados como sendo tumorogênicos: o vírus de fibroma de Shope e o vírus de macaco Yaba causam lesões cutâneas benignas em coelhos e macacos *rhesus*, respectivamente. O potencial tumorogênico destes vírus, que têm genomas consideravelmente grandes (135 a 160 kb), permanece pouco compreendido até o presente.

Pesquisadores descobriram que partículas de adenovírus e herpesvírus contêm longas moléculas da DNA dupla fita (dsDNA) lineares que, assim como os genomas de RSV, carregam a informação necessária tanto para replicação viral quanto para a transformação celular induzida por vírus. Comparado com os papovavírus, os herpesvírus tinham genomas enormes (veja a Tabela 3.1), o que sugeria que eles carregavam um número proporcionalmente maior de genes. No final, foi o tamanho relativamente pequeno dos genomas de papovavírus que os tornou objetos atrativos de estudo para aqueles interessados nas origens moleculares do câncer.

A maior parte do pequeno grupo de genes em um genoma de papovavírus era, aparentemente, necessária para programar a replicação viral; incluído entre esses estavam vários genes envolvidos na codificação de proteínas que formam a capa capsídica da partícula viral. Isso indicou que

papovavírus poderia dedicar apenas uma pequena porção de seus genes ao processo de transformação celular.

Essa noção proporcionou a possibilidade de simplificar consideravelmente o problema câncer por reduzir o espectro de genes responsáveis e mecanismos causais a um número bem menor. Sem tais simplificações, biólogos em câncer eram forçados a pesquisar os genes causadores de câncer que se acreditava estarem presentes no genoma de células transformadas por mecanismos não-virais. Genomas celulares claramente abrigavam grandes arranjos de genes, possivelmente mais de cem mil. Na época, a habilidade em analisar genomas de tal vasta complexidade e isolar genes individuais desses genomas era uma realidade um tanto quanto distante.

3.5 Vírus tumorais induzem mudanças múltiplas no fenótipo celular, incluindo aquisição de tumorigenicidade

Da mesma forma que células transformadas por RSV, as células transformadas por SV40 apresentavam um formato significativamente alterado e empilhavam-se umas sobre as outras. Essa perda da inibição por contato foi apenas uma de uma série de mudanças exibidas por células transformadas por vírus (Tabela 3.2). Como será discutido posteriormente neste livro, células normais em cultura não proliferarão, a menos que sejam providas com soro e fatores estimuladores de crescimento associados ao soro no meio de cultura. Observou-se que as células transformadas por uma variedade de vírus tumorais tinham, freqüentemente, uma redução substancial da necessidade desses fatores em seu meio de cultura.

Uma outra característica típica do estado transformante é a habilidade de proliferar em cultura por períodos mais longos do que as células normais. Pesquisadores descobriram que células normais têm um potencial proliferativo limitado em cultura, encerrando sua multiplicação após um número, aparentemente, pré-determinado de divisões celulares. Células cancerígenas pareciam ser capazes de se proliferar indefinidamente em cultura, sendo, portanto, descritas como *imortalizadas* (como discutido no Capítulo 10).

Quando células transformadas eram suspensas em um gel de agar, elas eram capazes de proliferar formando colônias esféricas contendo dúzias, ou mesmo centenas, de células (Figura 3.12). Essa habilidade de multiplicação sem adesão a um substrato sólido, provido pelo fundo de uma placa de Petri, foi denominada de traço de **independência de ancoragem**. Células normais, em contraposição, demonstraram uma necessidade absoluta de aderirem-se a um substrato sólido antes de crescerem e foram, portanto, consideradas **dependentes de ancoragem**. A habilidade das células em crescer de forma independente de ancoragem *in vitro* geralmente servia como um bom indicativo de sua habilidade em formar tumores *in vivo* após injetadas em animais hospedeiros apropriados.

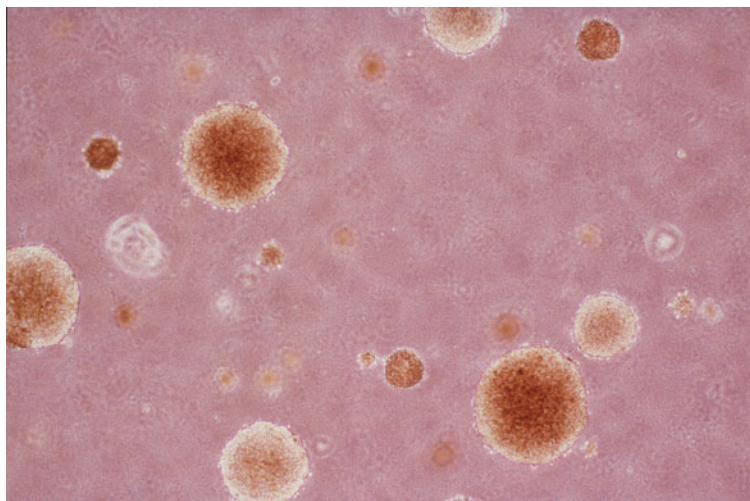
Essa habilidade em formar tumores – o fenótipo de tumorigenicidade – representou o teste decisivo para determinar se células eram totalmente transformadas, ou seja, se tinham adqui-

Tabela 3.2 Propriedades das células transformadas

Morfologia alterada (formato arredondado, refrátil sob microscópio de contraste de fase)
Perda da inibição por contato (habilidade de crescer umas sobre as outras)
Habilidade de crescer sem adesão a substrato sólido (independente de ancoragem)
Habilidade de proliferar indefinidamente (imortalização)
Necessidade reduzida de fatores de crescimento mitogênicos
Alta densidade de saturação (habilidade de acumular grande número de células em placa de cultura)
Inabilidade em conter a proliferação em resposta a falta de fatores de crescimento
Transporte de glicose aumentado
Tumorigenicidade

Adaptada, em parte, de S.J. Flint, L.W. Enquist, R.M. Krug et al., *Principles of Virology*. Washington, DC: ASM Press, 2000.

Figura 3.12 Crescimento independente de ancoragem. Fotomicrografia de colônias celulares crescendo na forma independente de ancoragem. (Cada uma das colônias maiores observadas na figura pode conter muitas centenas de células.) Esse teste é geralmente realizado suspendendo-se as células em meio semi-sólido, como agarose ou metilcelulose. Ao conter células em suspensão, esses meios garantem que as células sejam impossibilitadas de aderir-se a um substrato sólido, mais especificamente, o fundo da placa de Petri. A habilidade celular em proliferar enquanto mantidas em suspensão – o fenótipo independente de ancoragem – em geral é um bom (mas não infalível) indicador da habilidade de tais células em formar tumores *in vivo*. (Cortesia de A. Orimo.)



rido todo repertório de características neoplásicas. Testes para tumorigenicidade poderiam ser realizados quando as células utilizadas em um experimento de transformação *in vitro* fossem preparadas a partir de uma cepa de camundongo e posteriormente injetadas em um camundongo hospedeiro da mesma linhagem (Barra lateral 3.3). Uma vez que as células do hospedeiro e as células injetadas provêm da mesma linhagem genética, os sistemas imunes de tal hospedeiro (camundongo) **singênico** não reconheceriam as células transformadas como sendo corpos estranhos e, portanto, não tentariam eliminá-las – o processo de **rejeição tumoral** (processo cuja discussão será retomada no Capítulo 15). Isso possibilitou que células injetadas sobrevivessem em seus hospedeiros animais, permitindo-lhes multiplicar formando grandes tumores quando, de fato, adquirissem o fenótipo tumorigênico.

Em geral, era impossível testar a tumorigenicidade de células tumorais infectadas por vírus em um hospedeiro animal singênico, visto que as células em estudo provinham de uma espécie em que não havia disponibilidade de hospedeiros singênicos endocruzados. Isso forçou o uso de hospedeiros **imunocomprometidos** cujos sistemas imunes eram tolerantes a uma ampla variedade de tipos celulares estranhos, incluindo aqueles de outras espécies (veja Barra lateral 3.3). Camundongos da linhagem Nude logo tornaram-se o hospedeiro mais

Barra lateral 3.3 A integridade do sistema imune dita o potencial de células transformadas em causar tumores Uma série linhagens distintas de camundongo e ratos foram desenvolvidas a partir de ciclos repetidos de endocruzamento ao longo do século passado. Em função desse endocruzamento, cada indivíduo de uma linhagem endocruzada de camundongo é geneticamente idêntico a todos os outros membros dessa linhagem (exceto as diferenças específicas de gênero criadas pelo cromossomo Y). Entre essas linhagens de camundongos, estão incluídas, por exemplo, as linhagens BALB/c, C3H e C57/B16. A identidade genética de todos os indivíduos dentro de uma linhagem significa que fragmentos teciduais (incluindo tumores) de um animal de uma linhagem podem ser transplantados a outros animais da mesma linhagem e se tornar estabelecidos nos animais receptores.

Essa habilidade de transplantar tecidos de um indivíduo para outro não existe em populações entre linhagens diferentes, como humanos e populações naturais de camundongos. Com raras exceções, como gêmeos idênticos, tecidos introduzidos de um animal (ou humano) para outro são rapidamente reconhecidos como sendo estranhos pelo sistema imune do receptor. O sistema imune passa então a se dedicar a

eliminar o tecido estranho, geralmente de forma bem-sucedida e rápida. Isso significa que testes verdadeiros de tumorigenicidade de células de camundongo transformadas *in vitro* podem ser realizados apenas quando essas células derivam da mesma linhagem de camundongos do hospedeiro nas quais foram introduzidas. A falta de linhagens endocruzadas de galinhas limitou consideravelmente o tipo de pesquisa em câncer que poderia ser realizado com tais aves.

Essa barreira envolvendo transplante pode ser contornada de diversas formas. Frequentemente, o sistema imune de um animal muito jovem é mais tolerante para tecidos geneticamente estranhos do que o sistema imune mais desenvolvido e robusto dos adultos. Isso permitiu que Rous conduzisse alguns de seus experimentos. Mais comum e prática, entretanto, é a utilização de cepas de camundongo **imunocomprometidas**, que carecem de um sistema imune totalmente funcional e, portanto, toleram tecidos enxertados de origem genética estranha, incluindo células e tecidos de outras espécies (denominados **xenotransplantes**). Entre as cepas de camundongo imunocomprometidas frequentemente utilizadas estão Nude, RAG e NOD/SCID, cada qual tendo um defeito em um ou mais componentes-chave de seu sistema imune.



Figura 3.13 Camundongos Nude
Camundongos da linhagem Nude têm duas vantagens em testes de tumorigenicidade. Visto que eles carecem de timo, eles são altamente imunocomprometidos e, portanto, relativamente receptivos ao enxerto de células de fontes não-relacionadas geneticamente, incluindo células de espécies estranhas. Além disso, uma vez que esses camundongos não possuem pêlos, torna-se fácil monitorar o progresso de formação de tumor após células transformadas terem sido injetadas sob a pele. (Cortesia de Harlan Sprague Dawley.)

comumente utilizado para testar a tumorigenicidade de uma grande variedade de células, incluindo aquelas de origem humana. Com certa frequência, candidatas a células tumorais são injetadas **subcutaneamente**, ou seja, diretamente sob a pele desses animais. Uma vez que eles também carecem da habilidade de desenvolver pêlos, camundongos Nude propiciam uma vantagem adicional de permitir ao experimentador que monitore de perto o progresso de células tumorais implantadas (Figura 3.13).

Como mencionado, os pequenos tamanhos dos genomas de vírus tumorais de RNA (RSV, por exemplo) e papovavírus ditaram que cada um destes utiliza apenas um pequeno número de genes (às vezes, não mais que um) para induzir mudanças múltiplas nas células que eles infectaram e transformaram. Cabe lembrar que a habilidade de um gene em induzir concomitantemente uma série de alterações distintas em uma célula é denominada pleiotropia. Apesar de haver poucas evidências diretas do número de genes de forma disponível, parecia muito provável que os genes utilizados por vírus tumorais para induzir transformação celular estavam atuando pleiotropicamente em uma variedade de alvos moleculares entre células.

3.6 Genomas de vírus tumorais persistem em células transformadas por vírus por tornarem-se parte do DNA celular do hospedeiro

Os experimentos de Berkeley (veja a Seção 3.3) proveram forte evidência de que as ações contínuas do genoma de RSV eram necessárias para manter o estado transformante das células, incluindo aquelas que foram afastadas há muitas gerações de uma célula progenitora inicialmente infectada. Isso significa que algumas ou todas as informações genéticas virais necessitavam ser perpetuadas de alguma forma, sendo passadas de uma célula-mãe transformada para suas duas filhas e, posteriormente, às células descendentes por meio de muitos ciclos de divisão e crescimento celular. Por outro lado, a falha na transmissão desses genes virais às células descendentes resultaria na sua reversão ao comportamento normal de crescimento celular.

Em paralelo com o comportamento de RSV, o nível de transformação celular alcançado por dois vírus tumorais de DNA intensamente estudados – SV40 e poliomavírus – também pareceu depender da presença contínua de genomas virais nos descendentes de uma célula inicialmente transformada. A evidência que comprovou isso veio de uma maneira indireta, principalmente a partir do descobrimento de proteínas associadas a tumores (antígenos T) que foram encontrados em cânceres induzidos por esses dois vírus. Por exemplo, soros preparados a partir de camundongos portando um tumor induzido por SV40 apresentaram forte reatividade com uma proteína nuclear que estava caracteristicamente presente em tumores desencadeados por SV40 e ausentes em tumores induzidos por poliomavírus ou por outros agentes carcinogênicos. A implicação foi que o genoma viral residindo em células tumorais

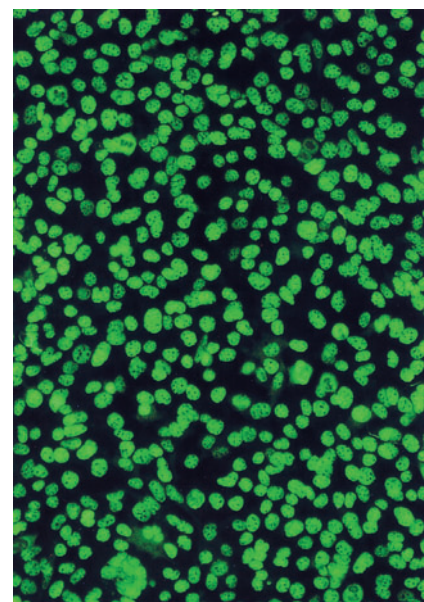


Figura 3.14 Expressão do antígeno T de SV40
Quando células transformadas por SV40 são introduzidas em um hospedeiro singênico, elas provocam uma forte resposta imune contra o antígeno T codificado por SV40 (antígeno tumoral), que é geralmente denominado “large T” (LT). Soro anti-LT, associado a marcadores fluorescentes apropriados, pode ser usado para corar células transformadas por vírus, revelando a localização nuclear do LT. Aqui está apresentada uma versão disso, em que um anticorpo monoclonal anti-LT (em vez de soro antitumor) foi usado para corar células de camundongo que foram transformadas por SV40. (Cortesia de S.S. Tevethia.)

codificava uma proteína (o antígeno T de SV40, por exemplo) que induzia uma forte resposta imunológica no camundongo ou rato hospedeiro que carregava o tumor (Figura 3.14).

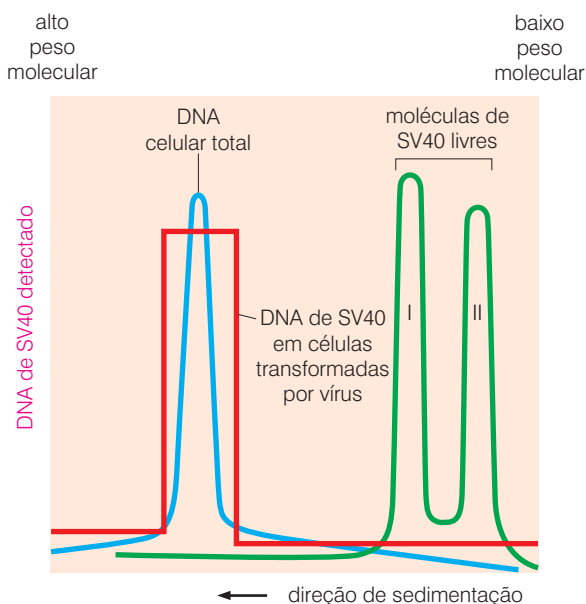
O aspecto do antígeno T induzido por vírus correlacionou-se diretamente com o estado transformado dessas células. Portanto, as células que perderam o antígeno T também perderiam o fenótipo transformante induzido pelo vírus. Essa correlação sugeria, mas dificilmente provaria, que as seqüências virais responsáveis pela transformação estavam associadas, ou proximamente ligadas, a seqüências virais que codificam o antígeno T.

A transmissão de célula para célula de genomas virais ao longo de várias gerações celulares representou um grande problema conceitual. Genes celulares eram claramente transmitidos com fidelidade quase total de células-mães a células-filhas a partir do cuidadoso processo programado de replicação do DNA cromossômico e da mitose que ocorrem durante cada ciclo de crescimento e divisão celular. Como poderiam genomas virais realizar replicação e transmissão eficientemente a partir de um número ilimitado de gerações celulares? Isso era excepcionalmente intrigante, uma vez que genomas virais pareciam carecer dos elementos genéticos que imaginava-se serem necessários para alocação apropriada de cromossomos a células-filhas durante a mitose.

Aliado a esse problema estava o fato de que o metabolismo do DNA de papovavírus, como SV40 e poliomavírus, era muito diferente daquele de células hospedeiras que eles predavam. Quando SV40 e poliomavírus infectavam células hospedeiras permissivas, os DNAs virais eram replicados como moléculas autônomas extracromossomais. Os dois vírus podiam formar muitas dezenas de milhares de genomas de DNA circulares dupla fita de cerca de 5 kb de tamanho a partir de um único genoma de DNA viral inicialmente introduzido pela infecção (veja a Figura 3.11). Enquanto a replicação do DNA viral recorria a um grande número de enzimas de replicação do DNA da célula hospedeira, isso procedia independentemente da replicação do DNA cromossomal das células infectadas. Essa replicação não-cromossomal que ocorria durante os ciclos líticos de SV40 e poliomavírus não esclareceram como esses genomas virais eram perpetuados em populações de células transformadas por vírus. Estas últimas eram, enfim, não-permissivas e, portanto, inviabilizavam tais vírus de replicarem seu DNA.

Uma solução para esse “quebra-cabeça” surgiu em 1968, quando foi descoberto que o DNA viral em células transformadas por SV40 estava intimamente associado ao seu DNA cromossomal. Utilizando-se técnicas de centrifugação para medir os pesos moleculares de moléculas de DNA, tornou-se claro que o DNA de SV40 em tais células não sedimentava da mesma forma que um pequeno (~5 kb) genoma de DNA viral. Em vez disso, as seqüências de DNA de SV40 em células

Figura 3.15 Integração do DNA de SV40
Moléculas de DNA de células transformadas por SV40 foram isoladas e sedimentadas por centrifugação a partir de uma solução alcalina estabilizada por um gradiente de sucrose (utilizado para prevenir a mistura de diferentes extratos fluidos no tubo de centrifugação). Nessas condições, o grande peso molecular do DNA celular (azul) sedimentou a uma distância substancial para baixo no gradiente de sucrose (*lado esquerdo do gráfico*). Em contraposição, o DNA de SV40 isolado de partículas virais (*verde*) sedimentou mais lentamente um indicativo de seu peso molecular menor. As formas I e II de DNA viral referem-se aos DNAs de SV40 nas formas circular fechado e circular relaxado, respectivamente (Figura 3.11). A utilização de hibridização de ácidos nucléicos revelou que seqüências de DNA de SV40 em células transformadas pelo vírus SV40 co-sedimentavam com o DNA cromossomal de alto peso molecular das células transformadas pelo vírus (*vermelho*). (Adaptada de J. Sambrook et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 60: 1288-1295, 1968.)



transformadas por vírus co-sedimentavam com o DNA cromossomal de alto peso molecular (> 50 kb) das células hospedeiras (Figura 3.15). Na verdade, o DNA viral nas células transformadas não podia ser separado do DNA cromossomal celular mesmo pelos métodos mais estridentes de dissociação, incluindo o agressivo tratamento de exposição a pH alcalino.

Tais resultados indicavam que o DNA de SV40 em células transformadas por vírus havia se tornado covalentemente ligado ao DNA cromossomal. Tal **integração** do genoma viral solucionou um importante problema envolvendo transformação viral: a transmissão de seqüências de DNA viral de uma célula-mãe para sua prole poderia ser garantida, uma vez que o DNA viral seria replicado juntamente com o DNA cromossômico de célula durante a fase S (síntese de DNA) de cada ciclo celular. Em função disso, ao integrar-se no cromossomo, as seqüências de DNA viral tornaram-se parte do genoma celular da mesma forma que os genes nativos da própria célula.

Alguns anos depois, essa habilidade dos genomas de papovavírus em integrarem-se nos genomas de células hospedeiras tornou-se muito relevante para a patogênese de uma forma comum de câncer humano – carcinoma cervical. A quase totalidade (> 99,7%) desses tumores parecia portar fragmentos de genomas de papilomavírus humano (HPV) integrados em seu DNA cromossômico. De forma excitante, genomas virais intactos eram raramente evidenciados na forma integrada em genomas de células cancerígenas. Em vez disso, foi encontrada apenas a porção do genoma viral que contém informações **oncogênicas** (causadoras de câncer) no DNA cromossomal dessas células cancerígenas, enquanto a porção que permite que tais vírus se repliquem e construam uma progênie de partículas virais estava quase sempre ausente, ou presente apenas na forma fragmentada.

3.7 Genomas retrovirais tornam-se integrados aos cromossomos de células infectadas

A habilidade de SV40 e poliomavírus em integrar cópias de seus genomas no DNA cromossômico de células hospedeiras solucionou um problema, mas criou outro que parecia muito menos solucionável: como RSV conseguia transmitir seu genoma através de muitas gerações dentro de uma linhagem celular? O genoma de RSV é feito de RNA de fita simples (Figura 3.16), que, evidentemente, não poderia ser integrado diretamente no DNA cromossomal de uma célula infectada. Ainda assim, RSV conseguiu transferir sua informação genética a partir de uma série sucessiva de ciclos de crescimento celular e divisão (Barra lateral 3.4).

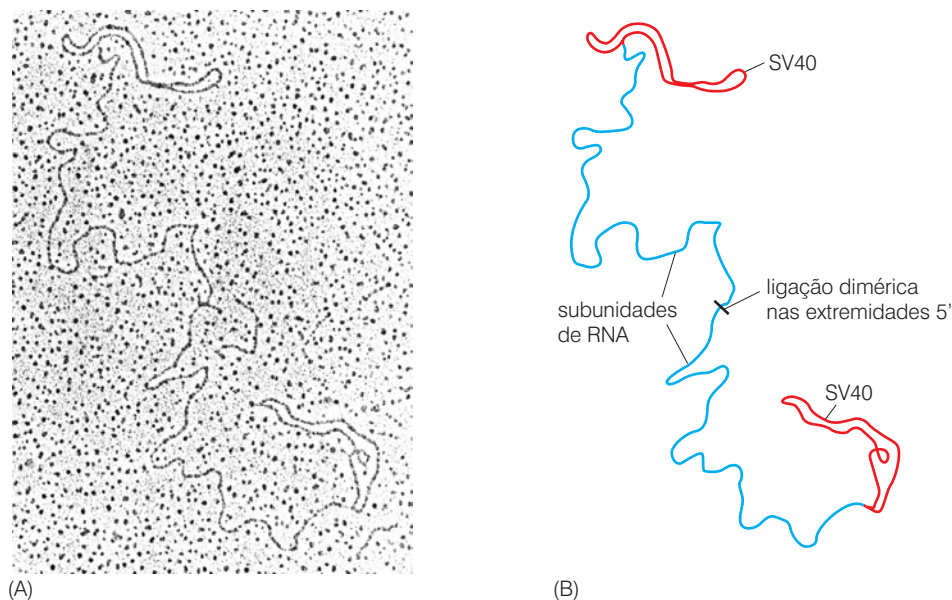


Figura 3.16 Estrutura do genoma de vírus tumorais de RNA Vírus como RSV portam genomas de RNA de fita simples (ssRNA). De modo único, os genomas dessa classe de vírus foram descobertos como sendo diplóides, ou seja, portavam duas cópias idênticas da seqüência genética viral. A organização de tais genomas foi revelada por, entre outras técnicas, microscopia eletrônica. (A) Esta micrografia eletrônica apresenta o genoma de um parente distante de RSV denominado “vírus endógeno de babuíno”. (B) Como está indicado no esquema, moléculas de dsDNA circular de SV40 (vermelho, acima, abaixo), para as quais caudas de oligodeoxitimidina (oligo dT) foram enzimaticamente fusionadas, têm sido usadas para marcar visualmente a extremidade 3' das duas moléculas de RNA virais de fita simples (azul). As moléculas de RNA viral (assim como as moléculas de mRNA celular) contêm poliadenilato nas suas extremidades 3' e, portanto, anelam-se às caudas de oligo dT aderidas às moléculas circulares de SV40. Como também indicado na figura, os dois ssRNAs estão associados nas suas extremidades 5'. (Adaptada de W. Bender e N. Davidson, *Cell* 7: 595-607, 1976.)

Barra lateral 3.4 A reinfecção não poderia explicar a transmissão estável de genomas de RSV A transmissão de genomas de RSV aos descendentes de células inicialmente infectadas poderia ser explicada, em princípio, por um mecanismo em que as células infectadas por vírus liberariam continuamente partículas virais que subsequentemente infectariam células-filhas. Tais ciclos repetidos de reinfecção podem assegurar que um genoma de RSV possa ser perpetuado indefinidamente em uma população de células sem necessidade de integração cromossômica de informação genética viral, como é o caso do vírus SV40 (Seção 3.6). Na realidade, a estável transformação de populações celulares por RSV foi também observada utilizando-se cepas de RSV que poderiam infectar e transformar uma célula, mas eram incapazes de replicar naquela célula. Além disso, certas populações celulares poderiam ser transformadas por uma infecção inicial por RSV, mas resistiam a subsequentes ciclos de reinfecção. Juntas, tais observações indicavam a reinfecção como sendo o meio pelo qual RSV perpetuava-se em linhagens celulares ao longo de múltiplas gerações celulares.

Esse enigma intrigou Temin em meados e no final dos anos 1960, fazendo com que ele propusesse uma solução não tão ortodoxa, a qual foi ridicularizada por muitos, levando-o a considerável descrédito científico. Temin argumentou que, após partículas de RSV (e aquelas de vírus relacionados) infectarem uma célula, ela produziria cópias de DNA dupla fita de seus genomas de RNA. Eram essas versões de dsDNA do genoma viral, dizia ele, que se estabeleciam no DNA cromossômico da célula hospedeira. Uma vez estabelecida, a versão de DNA do genoma viral – que ele chamou de **pró-vírus** – então assumia a configuração molecular de um gene celular e seria replicada cada vez que a célula replicasse seu DNA cromossômico. Além disso, o DNA pró-viral, uma vez estabelecido no genoma, poderia servir como um molde para transcrição pela RNA polimerase celular, produzindo, assim, moléculas de RNA que poderiam ser incorporadas na progênie de partículas virais ou, alternativamente, poderiam funcionar como RNA mensageiros (mRNA) que eram usados na síntese de proteínas virais (Figura 3.17).

O processo de **transcrição reversa** que Temin propôs – fazer cópias de DNA a partir de RNA – foi pioneiro na biologia molecular daquela época, que reconhecia o fluxo de informação apenas em uma única direção, ou seja, DNA → RNA → proteínas. Mas a idéia prevaleceu, recebendo importantes suportes a partir das descobertas simultâneas de Temin e David Baltimore, em 1970, de que RSV e partículas virais relacionadas portavam a enzima transcriptase reversa. Como ambos os grupos de pesquisa descobriram, essa enzima tem a capacidade de executar um passo-chave de cópia que Temin havia previsto – o passo necessário para RSV transmitir seu genoma por muitos ciclos de crescimento celular e divisão.

Logo tornou-se aparente que RSV era apenas um de um grande grupo de vírus de construção similar, que juntos vieram a ser chamados de **retrovírus** para refletir o fato de que

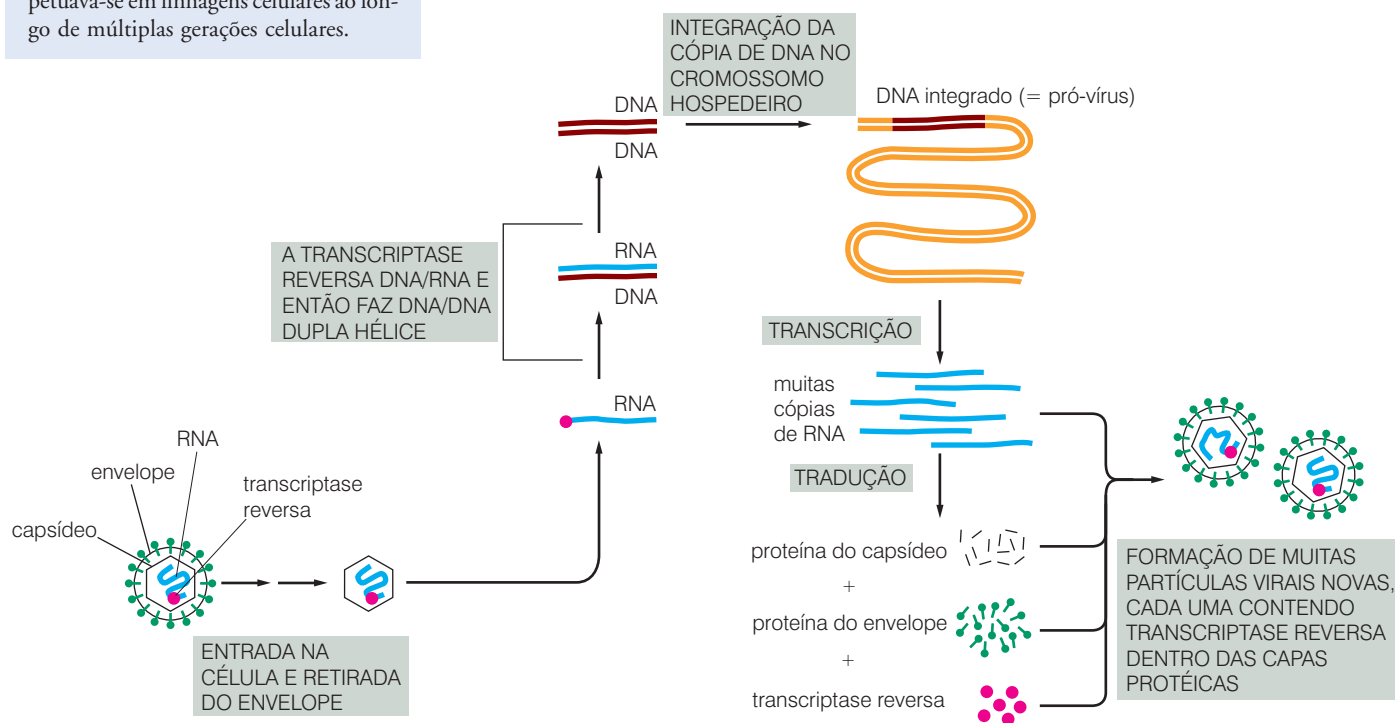


Figura 3.17 O ciclo de vida de um vírus tumoral de RNA semelhante a RSV O ciclo de replicação retroviral foi inicialmente proposto por Temin; posteriormente, os detalhes moleculares foram sendo revelados, como está descrito no esquema exposto na figura. Um virion infectante introduz seu genoma ssRNA (azul) no citoplasma de uma célula junto com a enzima transcriptase reversa (RT, vermelho). A RT faz uma cópia de DNA dupla fita (ds) (marrom) do RNA viral utilizando o RNA viral como molde. O DNA reversamente transcrito então se move para o núcleo,

onde se torna integrado ao DNA do cromossomo celular (laranja). O pró-vírus integrado resultante é transcrito em moléculas de ssRNA (azul) pela RNA polimerase II (pol II) da célula hospedeira. A progênie de moléculas de RNA é exportada ao citoplasma, onde podem servir como mRNAs para fazer proteínas virais ou são empacotadas como partículas virais progenitoras que evadem a célula e iniciam um novo ciclo de infecção. (De B. Albert et al., *Essential Cell Biology*, 2nd ed. New York: Garland Science, 2004.)

seus ciclos de replicação dependem do fluxo de informação ocorrer no “sentido contrário”, de RNA para DNA. Passado um ano do descobrimento da transcriptase reversa, a presença do DNA pró-viral foi detectada no DNA cromossomal de células infectadas por RSV. Assim, da mesma forma que SV40 e poliomavírus, os retrovírus recorrem à integração de seus genomas no cromossomo para assegurarem a estável retenção e transmissão de seus genomas.

Existe, entretanto, uma importante distinção entre os mecanismos de integração usados por retrovírus, como RSV, e os vírus tumorais de DNA, como SV40 e poliomavírus. A integração é uma parte normal e essencial do ciclo de replicação de retrovírus. Mas, no caso de vírus tumorais de DNA, a integração cromossomal de seus genomas representa um evento consideravelmente raro ($\ll 1$ por 1.000 infecções) que viabiliza a perpetuação de genomas virais nos descendentes de uma célula inicialmente infectada; os poucos genomas de SV40 que conseguem se estabelecer no DNA cromossomal são encontrados integrados em uma forma aleatória que geralmente inclui apenas fragmentos do genoma do tipo selvagem (Figura 3.18).

3.8 Uma versão do gene *src* de RSV também está presente em células não-infectadas

Uma vez que os genomas de retrovírus, como os de papovavírus, eram um tanto quanto pequenos (< 10 kb), pareceu possível que a capacidade codificante dos genomas retrovirais estivesse limitada a um pequeno número de genes, possivelmente muito menos de 10. Usando esse pequeno repertório de genes, os retrovírus, no entanto, tiveram sucesso em especificar algumas proteínas virais necessárias para replicação do genoma viral, outras necessárias para construção e agrupamento da progênie de partículas virais e outras proteínas utilizadas para transformar células infectadas.

No caso de RSV, a utilização de vírus mutantes revelou que as funções da replicação viral (incluindo transcrição reversa e construção da progênie de virions) requeriam um conjunto de genes, enquanto a função de transformação viral requeria um outro. Portanto, algumas versões mutantes de RSV poderiam replicar perfeitamente bem em células infectadas, produzindo uma ampla progênie de partículas virais, ainda que tais mutantes carecessem da função transformante. Em contraposição, outras derivações mutantes de RSV poderiam transformar células, mas haviam perdido a habilidade de replicação e produção de progênie de virions nessas células transformantes.

Pelo menos três genes retrovirais estavam envolvidos na replicação viral. Dois destes codificam proteínas estruturais que são necessárias para a montagem das partículas virais; uma terceira específica a enzima transcriptase reversa (RT), que copia RNA viral em DNA logo após partículas retrovirais entrarem nas células hospedeiras. Uma comparação do RNA genômico de RSV com os genomas de retrovírus relacionados que carecem da habilidade transformante sugeriu que provavelmente havia pouca informação no genoma de RSV que se destinava a codificação da função viral remanescente – a transformação. Conseqüentemente, geneticistas que trabalhavam com RSV especularam que todas as funções transformantes virais residiam em um único gene, o qual chamaram de *src* (pronunciado “sark”), para indicar sua função no desencadeamento da formação de sarcomas em galinhas infectadas (Figura 3.19).

Em 1974, o trabalho conjunto de J. Michael Bishop e Harold Varmus na Universidade da Califórnia, São Francisco, visou produzir uma sonda de DNA que reconhecesse especificamente seqüências associadas à transformação (i. e., *src*) do genoma de RSV para compreender melhor suas origens e funções (veja a Barra lateral 3.5). Essa sonda específica para *src* foi então utilizada para acompanhar o destino do gene *src* após as células serem infectadas com RSV. A questão aqui era que células não-infectadas de galinha não portariam seqüências de DNA relacionadas a *src* em seus genomas. Entretanto, após a infecção por RSV, as seqüências de *src* se tornariam imediatamente detectáveis em células, tendo sido introduzidas pelo genoma viral infectante.

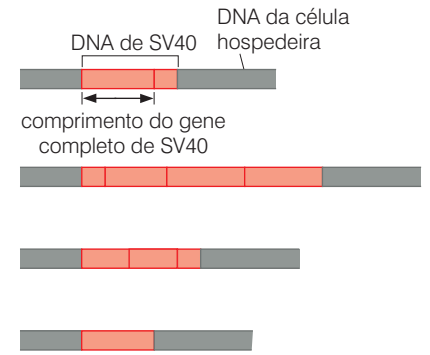
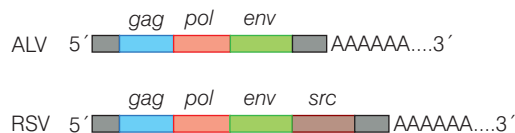


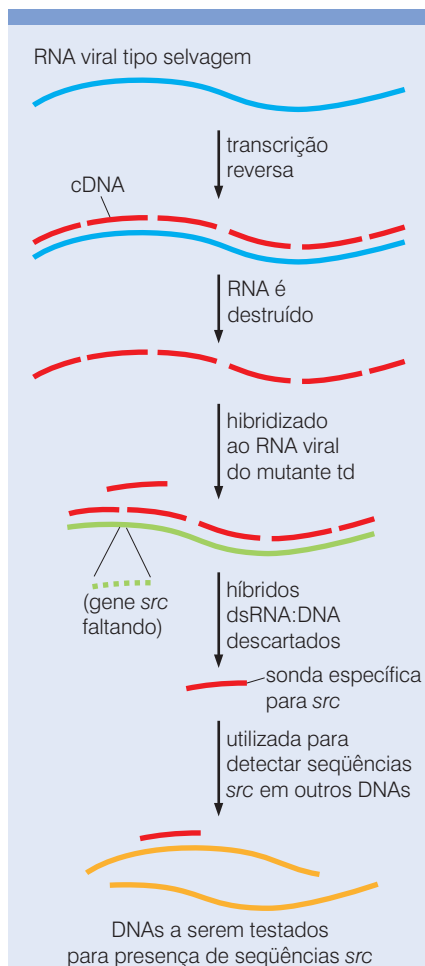
Figura 3.18 A configuração dos genomas de SV40 integrados. A utilização de mapeamento por clivagem de sítios para enzima de restrição revelou as configurações dos genomas integrados de SV40 no DNA cromossomal de células transformadas por vírus. Em algumas células, apenas uma porção do genoma viral estava presente; já em outras, havia múltiplos arranjos cabeça até cauda presentes em *tandem*. Esses eventos de integração envolviam a linearização do DNA circular de SV40 e algum tipo de recombinação aleatória não-homóloga (“illegítima”) entre o DNA viral e o DNA cromossomal, sem sítios específicos em qualquer DNA estando envolvidos nos eventos de recombinação. A única característica em comum compartilhada entre os genomas integrados era a presença da “região anterior” do genoma de SV40, que codifica as proteínas transformadoras virais, mais especificamente os antígenos “large T” e “small T”. Apresentados aqui estão quatro exemplos de como o DNA de SV40 se torna integrado ao DNA cromossomal de células. (Adaptada de M. Botchan, W. Topp, and J. Sambrook, *Cell* 9: 269-287, 1976.)

Figura 3.19 Estrutura do genoma do vírus do sarcoma de Rous O genoma de RNA de RSV está intimamente relacionado com aquele de um agente infeccioso relativamente comum de galinhas, o vírus da leucose aviária (ALV). Note que o genoma de ALV codifica as proteínas *gag* que, junto com o RNA viral, formam o centro nucleoprotéico dessas partículas (veja a Figura 3.4); o gene *pol*, que codifica a transcriptase reversa; e o gene *env*, que especifica os espinhos glicoprotéicos do virion. O genoma de RSV ainda carrega um gene (*src*, marrom) que especifica a proteína Src, que causa transformação celular. Aqui não está indicada a estrutura especializada cap na extremidade 5' dessas moléculas de RNA.



O desfecho desse experimento foi, entretanto, totalmente diferente do esperado. Em 1975, o grupo de pesquisa, utilizando sua sonda específica para *src*, descobriu que seqüências *src* estavam claramente presentes entre seqüências de DNA de células não-infectadas de galinha. As seqüências *src* estavam presentes como genes cópia-única celulares; ou seja, duas cópias das seqüências de DNA relacionadas a *src* estavam presentes por genoma de célula diplóide de galinha – precisamente a representação da grande maioria de genes no genoma celular.

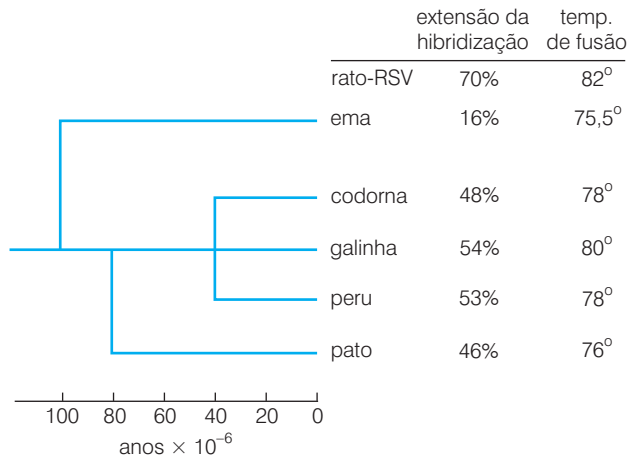
A presença de seqüências *src* no genoma de células de galinha não podia ser considerada um simples artifício do procedimento de hibridização usado para detectá-las. Além disso, após a cuidadosa caracterização dessas seqüências *src*, tornou-se menos provável que elas tenham sido inseridas no genoma de galinha por algum retrovírus. Por exemplo, seqüências de DNA relacionadas a *src* eram facilmente detectadas nos genomas de várias espécies de aves relacionadas e, mais distantemente na árvore evolucionária, nos DNAs de vários mamíferos (Figura 3.21). Quanto maior a relação de distância evolucionária de uma espécie às galinhas, mais fraca era a reatividade da sonda *src* com seu DNA. Isso foi precisamente o comportamento esperado de um gene celular que havia estado presente no genoma de uma espécie ancestral



Barra lateral 3.5 A produção de uma sonda de DNA específica para *src* Com a intenção de produzir uma sonda de DNA específica para *src*, um pesquisador que trabalhava no laboratório de Bishop e Varmus explorou dois tipos de cepas do vírus RSV: um genoma de RSV do tipo selvagem que carregava todas as seqüências necessárias para replicação e transformação viral e um genoma de RSV mutante que conseguia se replicar, mas perdera as seqüências de *src* necessárias para transformação, devido a uma grande deleção de seqüências gênicas (Figura 3.20). Utilizando-se da transcriptase reversa, ele produziu uma cópia de DNA das seqüências do tipo selvagem, produzindo moléculas de DNA de fita simples (ssDNA) complementares ao RNA viral. Ele então fragmentou esse DNA e hibridizou-o ao RNA genômico do RSV mutante deletado que carecia de seqüências *src*, criando moléculas híbridas DNA-RNA. Ele então recuperou as moléculas ssDNA que falharam em formar híbridos DNA-RNA (descartando aquelas que de fato formaram híbridos). O resultado foram fragmentos de ssDNA que reconheciam especificamente seqüências contidas na porção deletada do genoma RSV mutante, ou seja, aquelas localizadas no gene *src*.

Uma vez que a transcrição reversa inicial do RNA de RSV tipo selvagem foi conduzida na presença de deoxirribonucleosídeos trifosfatados marcados radioativamente, os fragmentos de DNA específicos para *src* (que constituíam a “sonda” *src*) também foram marcados com radioisótopo. Isso possibilitou esclarecer se DNAs de interesse (como DNAs preparados de células infectadas ou não-infectadas por vírus) também portavam seqüências *src*, determinando-se se de fato a sonda *src* (com sua radioatividade associada) era capaz de hibridizar esses DNAs celulares.

Figura 3.20 A construção de uma sonda de DNA específica para *src* RNA (azul) de RSV do tipo selvagem (wt) foi reversamente transcrito sob condições em que apenas uma molécula de DNA complementar de fita simples (ss) (um cDNA; vermelho) foi sintetizada. O DNA viral wt de fita simples foi então anelado (hibridizado) ao RNA viral (verde) do mutante de RSV defeitivo na transformação (td), que perdera sua função transformante e, aparentemente, deletou seu gene *src*. Os híbridos dsRNA/DNA resultantes foram descartados, deixando para trás o fragmento ssDNA do wtDNA que falhou em hibridizar ao RNA do mutante td. Este fragmento de DNA sobrevivente, se radiomarcado, poderia então ser utilizado como sonda específica para *src* para detectar seqüências relacionadas a *src* em vários DNAs celulares (*laranja*).



comum e havia adquirido seqüências de DNA cada vez mais divergentes, ao passo que espécies descendentes evoluíram de maneira progressiva, afastando-se umas das outras ao longo do curso de milhões de anos.

A evidência convergiu na idéia de que as seqüências *src* presentes no genoma de uma célula de galinha não-infectada possuíam todas as propriedades de um gene celular normal, estando presente em cópia-única por genoma haplóide, evoluindo lentamente por dezenas de milhões de anos e estando presente em espécies vertebradas que eram ancestrais tanto de aves quanto de mamíferos. Essa noção criou uma revolução na forma de pensar sobre as origens do câncer.

3.9 RSV utiliza um gene celular raptado para transformar células

A presença de um gene *src* altamente conservado no genoma de um organismo normal implica que essa versão celular de *src*, algumas vezes denominada de *c-src* (i. e., *src* celular), desempenha um papel na vida de tal organismo (a galinha) e suas células. Como poderia essa função estar relacionada com a presença de um gene *src* transformante carregado no genoma de RSV? O gene transformante viral (*v-src*) era consideravelmente similar ao gene *c-src* da galinha, ainda que os dois tivessem efeitos e funções aparentes muito distintos. Quando estabelecido no genoma celular, as ações de *c-src* eram aparentemente compatíveis com o comportamento celular normal e desenvolvimento normal do organismo. Em contraposição, o gene *v-src* extremamente similar oriundo do genoma de RSV atuou como um potente **oncogene** – um gene capaz de transformar uma célula normal de galinha em uma célula tumoral.

Uma solução para esse “quebra-cabeça” surgiu ao considerar-se a possibilidade de que talvez o gene *src* de RSV não estivesse naturalmente presente no genoma do retrovírus ancestral a RSV. Esse ancestral viral hipotético, enquanto carecendo de seqüências *src*, era perfeitamente capaz de replicação em células de galinha. Na verdade, tal retrovírus *src*-negativo – vírus da leucose aviária (ALV) – era comum em galinhas e era capaz de dispersar-se infecciosamente de uma galinha para outra (veja a Barra lateral 3.6). Isso sugeriu que, durante o curso de infecção de uma célula de galinha, um vírus ancestral, similar a esse vírus comum de galinha, havia adquirido seqüências do genoma da célula hospedeira (Figura 3.22), a partir de algum tipo de truque genético. As seqüências celulares adquiridas (p. ex., seqüências *src*) foram então incorporadas ao genoma viral, adicionando, assim, um quarto gene aos três existentes que esse retrovírus (assim como retrovírus similares) utilizava para sua replicação em células infectadas (veja a Figura 3.19). Uma vez presente no genoma de RSV, o gene *src* raptado poderia então ser alterado e utilizado pelo RSV vírus para transformar células subsequentemente infectadas.

Figura 3.21 Árvore evolutiva do gene *src* A sonda de cDNA específica para *src* (veja a Figura 3.20) foi anelada com os DNAs de uma variedade de espécies aviárias – cujo parentesco à galinha está indicado nesta árvore evolutiva – assim como com a célula de rato que havia sido recentemente infectada e transformada pelo RSV. A época, no distante passado evolutivo, em que o último ancestral comum compartilhado por vários pares de espécies viveu está indicada pela abscissa abaixo. A melhor hibridização entre a sonda *src* de RSV foi com o DNA de uma célula de rato transformada por RSV carregando um pró-vírus RSV (utilizado como um controle positivo), como está indicado pela porcentagem de radioatividade da sonda que anelou com esse DNA celular e pela temperatura de fusão (T_m) do híbrido resultante. (Uma alta temperatura de fusão indica um alto nível de complementaridade de seqüência entre duas fitas de um híbrido; uma baixa temperatura de fusão indica muito pouca complementaridade de seqüência entre as duas seqüências de DNA aneladas.) O DNA de galinha anelou com a sonda *src*, em menor grau, e os híbridos resultantes foram desnaturados a uma temperatura levemente menor, indicando que a seqüência do gene *src* de RSV diferencia-se levemente do gene relacionado no genoma de galinha. Os proto-oncogenes *src* de espécies que foram posteriormente afastadas evolutivamente das galinhas apresentaram um menor grau de hibridização, e os híbridos formados anelaram a temperaturas mais baixas. Trabalhos subsequentes, não apresentados aqui, revelaram a presença de seqüências *src* no DNA de organismos pertencentes a outro filo dos metazoários, como artrópodes (*Drosophila melanogaster*, por exemplo) e até mesmo uma esponja. (Cortesia de H.E. Varmus.)

Barra lateral 3.6 Vírus semelhantes a RSV têm vidas muito curtas Evidências circunstanciais indicam que a infecção de uma célula de galinha por um vírus semelhante ao vírus da leucose aviária (ALV) resultaram na introdução de uma cópia de gene *c-src* de galinha no genoma de ALV, criando o vírus híbrido que chamamos de RSV. Esse evento de recombinação parece ter ocorrido apenas uma vez no século XX; ou seja, todos os retrovírus de galinha que contêm *src* parecem descender do RSV que surgiu em uma ocasião em uma gaiola de galinhas por volta de 1909. O descobrimento de RSV dependeu de uma circunstância fortuita: Peyton Rous só foi capaz de estudar o vírus porque um criador de galinhas de Long Island, Nova Iorque, lhe trouxe uma galinha premiada que tinha um tumor com a esperança de que Rous pudesse ser capaz de curar a ave de seu câncer.

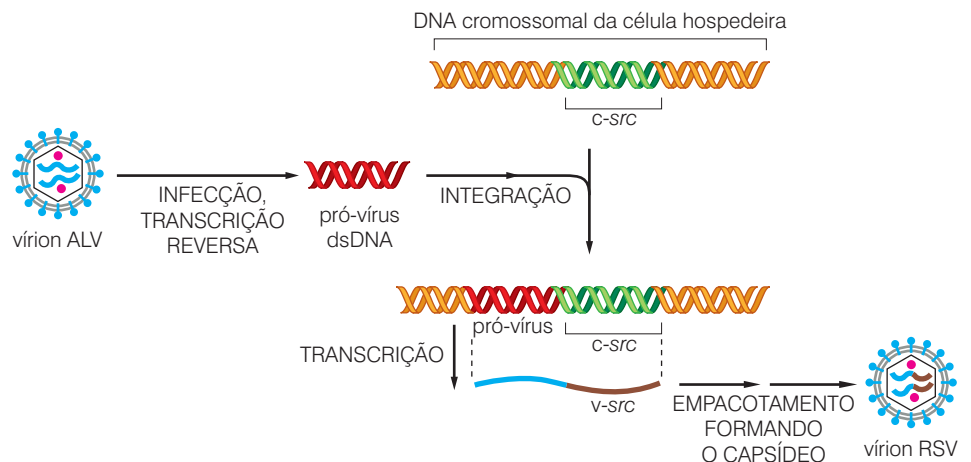
A presença do gene *src* adquirido no genoma viral não confere vantagens óbvias de crescimento nesse vírus, e RSV não é naturalmente disseminado de animal para animal. Além disso, retrovírus similarmente configurados posteriormente descritos, que também portam tanto a sequência viral quanto celular em seus genomas, disseminam-se pobremente de um animal hospedeiro para outro, geralmente porque eles têm genes essenciais de replicação viral deletados de seus genomas para acomodar oncogenes adquiridos de origem celular. Por essas razões, parece claro que retrovírus híbridos como RSV surgem a partir de eventos genéticos raros de recombinação entre animais infectados, criam tumores nesses animais e desaparecem quando eles morrem, exceto quando um atento criador de galinhas acaba por descobrir os tumores e repassa-os a um virologista interessado. Este último pode ou não conseguir isolar um retrovírus transformante a partir do tumor.

Esse esquema atribuiu considerável inteligência aos retrovírus por implicar que eles teriam a habilidade de apanhar e utilizar genes celulares preexistentes para seus próprios propósitos. Tal comportamento não é usual para um vírus, já que virtualmente todos os outros tipos de vírus portam genes que têm uma pequena, se alguma, relação com as sequências de DNA nativas às células que eles infectam (veja a Barra lateral 3.7).

Mas havia uma lição ainda mais importante a ser aprendida aqui, envolvendo o gene *c-src*. Esse gene celular, um entre dezenas de milhares no genoma celular de galinha, poderia ser convertido em um potente oncogene viral a partir de um leve remodelamento por um retrovírus tal como RSV. Uma vez que ele era um precursor a um oncogene viral, *c-src* foi chamado de **proto-oncogene**. O conceito de proto-oncogene foi revolucionário: ele implicava que genomas de células de vertebrados normais portavam um gene que tem o potencial, sob certas circunstâncias, de induzir transformação celular e então câncer.

As estruturas do proto-oncogene *c-src* e do oncogene *v-src* foram intensivamente estudadas nos anos seguintes a essas descobertas em 1975 e 1976. Como os geneticistas virais haviam

Figura 3.22 Captura de *src* pelo vírus da leucose aviária. O mecanismo preciso pelo qual um vírus da leucose aviária (ALV) captura um gene *c-src* não é conhecido. Um cenário plausível está aqui indicado. Assim, o DNA pró-viral AVL (vermelho) tornou-se integrado (ao acaso) próximo a um proto-oncogene *c-src* (verde) em uma célula infectada de galinha. O pró-vírus ALV e o gene *c-src* adjacente foram co-transcritos em um único transcrito de RNA híbrido (azul e marrom). Após eliminar os íntrons de *c-src* por *splicing* (não apresentado), este RNA viral híbrido foi empacotado, formando uma partícula viral que se tornou o ancestral do vírus do sarcoma de Rous (RSV). (Aqui não está apresentada a adesão de sequências ALV na porção 3' de *v-src*, já que este oncogene viral foi flanqueado em ambos os lados por sequências ALV.)



suspeitado, todas as seqüências transformantes virais residiam em um único oncogene viral. No RNA genômico de RSV, o gene *c-src* foi encontrado na extremidade 3' do genoma, juntamente com os três genes retrovirais preexistentes que estavam envolvidos na replicação viral (veja a Figura 3.19).

Esse cenário de aquisição e ativação de *c-src* por um retrovírus levantou três outras idéias. Primeiro, se retrovírus pudessem ativar o proto-oncogene em um potente oncogene, talvez outros tipos de mecanismos mutacionais pudessem operar para produzir um desfecho similar a partir da sua habilidade em remodelar o gene *c-src* normal. Talvez esses outros mecanismos mutacionais tenham causado a ativação de um proto-oncogene celular em um oncogene sem remover o gene normal de seu sítio normal no cromossomo celular. Talvez a informação para induzir câncer já estivesse presente no genoma celular normal, esperando para ser desmascarada.

Segundo, tornou-se claro que todos os poderes transformantes de RSV derivaram da presença de um único gene – *v-src* – em seu genoma. Isso foi de grande importância, já que implicava que um único oncogene poderia, como se suspeitava, produzir um grande número de mudanças no formato, no metabolismo e no crescimento de uma célula. Mais amplamente, isso sugeriu que outros genes causadores de câncer também poderiam atuar pleiotropicamente. Como consequência, se uma célula transformada, tumorogênica, diferisse de uma célula normal em 20 ou 30 traços distintos, talvez essas múltiplas mudanças não fossem dependentes da alteração de 20 ou 30 genes diferentes; em vez disso, talvez um pequeno número de genes fosse suficiente para transformar uma célula normal em tumorogênica.

Terceiro, RSV e seu oncogene *v-src* podem representar um modelo para o comportamento de outros tipos de retrovírus que eram similarmente capazes de transformar células infectadas *in vitro* (na placa de cultura) e induzir tumores *in vivo* (em tecidos vivos). Talvez esses outros retrovírus transformantes tivessem adquirido outros genes celulares não-relacionados a *src*. Enquanto *c-src* foi certamente o primeiro proto-oncogene celular a ser descoberto, talvez outros proto-oncogenes celulares estivessem escondidos no ge-

Barra lateral 3.7 Qual a origem dos vírus e de seus genes? O descobrimento das origens celulares do gene *src* de RSV no laboratório de Varmus e Bishop provocou o questionamento de onde a maioria dos genes virais provém e como se originavam os vírus. A replicação do genoma viral – em ambos os ciclos de replicação de DNA e RNA viral – é executada com muito menos fidelidade do que a replicação do DNA celular. Como consequência, seqüências genômicas virais evoluem muito mais rapidamente do que seqüências genômicas de células de metazoários. Assim, quaisquer traços de seqüências precursoras de genes que possam ter estado presentes em outros vírus ou em células foram apagados por essa rápida evolução há centenas de milhões de anos.

É provável que nunca saibamos onde e como a maioria dos genomas virais foi originada. Presumivelmente, os vírus têm estado presentes desde o aparecimento das células que eles parasitam. Alguns tipos de vírus podem ter surgido como genes celulares renegados que foram separados dos genomas celulares e tiveram de seguir por conta própria. Vírus de RNA podem, talvez, representar vestígios de formas primárias de vida celular que utilizavam moléculas de RNA como genomas e, no caso de retrovírus, de um estágio mais avançado de evolução celular quando uma enzima celular do tipo transcriptase reversa permitiu a transição de genomas de RNA para DNA.

Independentemente da sua origem, a maioria dos genes virais não tem uma relação óbvia com os genes de seus hospedeiros. Isso destaca a singularidade do achado de Varmus e Bishop de que retrovírus pode aparentemente adquirir e **transduzir** (carregar em seus genomas) genes celulares, de forma promíscua. Essa flexibilidade de seus genomas sugeriu uma nova aplicação de retrovírus, que começou a aflorar na metade dos anos 1980: uma variedade de genes interessantes foi introduzida em genomas virais por meio de técnicas de DNA recombinante. Os genomas virais resultantes foram então usados como **vetores** para transduzir tais genes em culturas celulares *in vitro* e em tecidos vivos *in vivo* (esta última aplicação geralmente sendo referida como “terapia gênica”).

noma celular de vertebrados, esperando para serem apanhados e ativados por algum retrovírus de passagem.

3.10 O genoma de vertebrados carrega um grande grupo de proto-oncogenes

Um acidente da história – um encontro em 1909 entre um criador de galinhas de Long Island e Peyton Rous – possibilitou que o RSV fosse o primeiro retrovírus tumorogênico a ser isolado e caracterizado detalhadamente. Como consequência, o RSV foi inicialmente favorecido com as mais detalhadas análises moleculares e genéticas. Entretanto, nas décadas de 1950 e 1960, um outro grupo de vírus tumorais de galinhas e roedores foi descoberto e subseqüentemente reconhecido como sendo membro, como o RSV, da classe dos retrovírus.

A diversidade desses outros retrovírus transformantes e as doenças que eles causavam sugeriu que eles, assim como o RSV, poderiam estar portando proto-oncogenes celulares seqüestrados e usando-os para transformar células infectadas. Assim, após um ano do descobrimento de *v-src* e *c-src*, começaram a ser revelados alguns outros vírus, que haviam passado por um caminho genético similar e apanhado outros proto-oncogenes potencialmente interessantes.

Um outro retrovírus de galinha – o vírus da mielocitomatose MC29 –, que é conhecido por ser capaz de induzir a formação de tumores malignos em medula óssea de galinhas, foi um dessa classe. O MC29 revelou portar um gene celular adquirido em seu genoma denominado oncogene *v-myc* que utilizava para induzir tumores de rápido crescimento em galinhas infectadas. Como foi o caso de *v-src*, a origem do gene *v-myc* pôde ser relacionada a um proto-oncogene correspondente residente do genoma de galinhas normais. Da mesma forma que *src*, *myc* passou por um certo remodelamento após ter sido incorporado ao genoma retroviral. Esse remodelamento conferiu potentes poderes oncogênicos a um gene que, previamente, tinha um papel benigno e possivelmente essencial na vida de células normais de galinha.

Outro descobrimento interessante foi que MC29, assim como RSV, descendeu do vírus da leucose aviária (ALV). Isso reforçou a noção de que retrovírus como ALV eram peritos em adquirir pedaços aleatórios de um genoma celular. Os poderes biológicos dos vírus híbridos resultantes dependeriam, presumivelmente, de em que genes celulares particulares teriam sido apanhados. No caso da grande maioria dos genes celulares adquiridos, vírus híbridos portando tais genes não apresentariam fenótipos óbvios como potencial de indução tumoral. Apenas quando um gene celular promotor de crescimento, ou seja, um proto-oncogene, fosse adquirido é que o vírus híbrido exibiria um fenótipo indutor de câncer que poderia levar ao seu descobrimento e isolamento por um virologista.

Descobriu-se que mamíferos também abrigam retrovírus que estão distantemente relacionados ao ALV e, como ALV, são capazes de adquirir proto-oncogenes celulares e convertê-los em potentes oncogenes. Um deles é o vírus de leucemia felina, que adquiriu o oncogene *fes* em seu genoma, gerando o vírus do sarcoma felino e um vírus de leucemia híbrido de rato-camundongo, que em ocasiões distintas adquiriu dois diferentes proto-oncogenes: os retrovírus transformantes resultantes, vírus de sarcoma de Havey e Kirsten, portam os oncogenes *H-ras* e *K-ras*, respectivamente, em seus genomas. Em uma década, o repertório de oncogenes associados a retrovírus tinha crescido para mais de duas dúzias, sendo muitos deles denominados segundo os vírus em que foram originalmente descobertos (Tabela 3.3). Atualmente, mais de trinta proto-oncogenes distintos de vertebrados foram descritos assim.

Em cada caso, um proto-oncogene encontrado no DNA de uma espécie de mamífero ou ave era imediatamente detectável nos genomas de todos os outros vertebrados. Havia,

Tabela 3.3 Retrovírus muito transformantes e os oncogenes que eles adquiriram^a

Nome do vírus	Oncogene viral	Espécies	Principal doença	Natureza da oncoproteína
Sarcoma de Rous	<i>src</i>	galinha	sarcoma	TK não-receptor
Sarcoma Y73/Esh	<i>yes</i>	galinha	sarcoma	TK não-receptor
Sarcoma Fujinami	<i>fps</i> ^b	galinha	sarcoma	TK não-receptor
UR2	<i>ros</i>	galinha	sarcoma	RTK; ligante desconhecido
Mielocitomatose 29	<i>myc</i>	galinha	leucemia mielóide ^c	fator de transcrição
Vírus Mill Hill 2	<i>mil</i> ^d	galinha	leucemia mielóide	ser/thr cinase
Mieloblastose aviária E26	<i>myb</i>	galinha	leucemia mielóide	fator de transcrição
Mieloblastose aviária E26	<i>ets</i>	galinha	leucemia mielóide	fator de transcrição
Mieloblastose aviária ES4	<i>erbA</i>	galinha	eritroleucemia	receptor de hormônio tireóide
Mieloblastose aviária ES4	<i>erbB</i>	galinha	eritroleucemia	EGF RTK
Sarcoma murino 3611	<i>raf</i> ^e	camundongo	sarcoma	ser/thr cinase
SKV770	<i>ski</i>	galinha	endotelioma (?)	fator de transcrição
Reticuloendoteliase	<i>rel</i>	peru	linfoma de célula B imatura	fator de transcrição
Leucemia murina de Abelson	<i>abl</i>	camundongo	linfoma de pré-célula B	TK não-receptor
Sarcoma murino de Moloney	<i>mos</i>	camundongo	sarcoma, eritroleucemia	ser/thr cinase
Sarcoma murino de Harvey	H- <i>ras</i>	rato, camundongo	sarcoma	proteína G pequena
Sarcoma murino de Kirsten	K- <i>ras</i>	camundongo	sarcoma	proteína G pequena
Sarcoma murino de FBJ	<i>fos</i>	camundongo	osteossarcoma	fator de transcrição
Sarcoma felino de Snyder-Theilen	<i>fes</i> ^f	gato	sarcoma	TK não-receptor
Sarcoma felino de McDonough	<i>fms</i>	gato	sarcoma	CSF-1 RTK
Sarcoma felino de Gardner-Rasheed	<i>fgr</i>	gato	sarcoma	TK não-receptor
Sarcoma felino de Hardy-Zuckerman	<i>kit</i>	gato	sarcoma	fator de ação RTK
Sarcoma símio	<i>sis</i>	macaco woolly	sarcoma	PDGF
AKT8	<i>akt</i>	camundongo	linfoma	ser/thr cinase
Vírus aviário S13	<i>sea</i>	galinha	leucemia eritroblástica ^g	RTK; ligante desconhecido
Leucemia mieloproliferativa	<i>mpl</i>	camundongo	mieloproliferação	receptor TPO
Lab v. 30 de aves domésticas regionais	<i>eyk</i>	galinha	sarcoma	RTK; ligante desconhecido
Vírus de sarcoma aviário CT10	<i>crk</i>	galinha	sarcoma	adaptador SH2/SH3
Vírus de sarcoma aviário 17	<i>jun</i>	galinha	sarcoma	fator de transcrição
Vírus de sarcoma aviário 31	<i>qin</i>	galinha	sarcoma	fator de transcrição ^h
Vírus de sarcoma AS42	<i>maf</i>	galinha	sarcoma	fator de transcrição
Vírus Cas NS-1	<i>cbl</i>	camundongo	linfoma	fator de ubiquitilação dependente de SH2

CSF = fator estimulador de colônia; EGF = fator de crescimento epidermal; G = ligação ao GTP; PDGF = fator de crescimento derivado de plaquetas; RTK = receptor de tirosina cinase; ser/thr = serina/treonina; SH = segmento de homologia *src*; TK = tirosina cinase; TPO = trombopoietina.

^aNem todos os vírus que produziram estes oncogenes estão indicados aqui.

^bOrtólogo do oncogene *yes* de mamíferos.

^cTambém causa carcinomas e endoteliomas.

^dOrtólogo do oncogene *raf* de mamíferos.

^eOrtólogo do oncogene *mil* aviário.

^fOrtólogo do oncogene *fps* aviário.

^gTambém causa leucemias granulocíticas e sarcomas.

^hFunciona como um repressor transcricional.

Adaptada, em parte, de S.J. Flint, L.W. Enquist, R.M. Krug et al., Principles of Virology. Washington, DC: ASM Press, 2000. Também, em parte, de G.M. Cooper, Oncogenes. Boston: Jones and Barlett Publishers, 1995.

por exemplo, versões de *c-myc* em galinhas, camundongos e humanos, as quais pareciam funcionar exatamente da mesma forma em seus respectivos hospedeiros. O mesmo poderia ser dito de todos os outros proto-oncogenes que foram descobertos. Logo ficou claro que esse grande repertório de proto-oncogenes devia estar presente no genoma do vertebrado que foi o ancestral comum de todos os mamíferos e aves e, da mesma forma que a maioria dos outros no genoma de vertebrados, foi herdado por todas as espécies descendentes modernas.

Agora, após um quarto de século, reconhecemos que os retrovírus transformantes forneceram para os pesquisadores em câncer uma janela conveniente pela qual pudessem ver o genoma celular e o seu bando de proto-oncogenes. Sem eles, a descoberta dos proto-oncogenes teria sido consideravelmente difícil. Ao “pescar” esses genes a partir do genoma celular e revelar seus poderes latentes, os vírus lançaram a pesquisa do câncer para frente por décadas.

3.11 Retrovírus de transformação lenta ativam proto-oncogenes ao inserir seus genomas de modo adjacente a estes genes celulares

Como foi descrito anteriormente, cada um dos vários retrovírus tumorigênicos surgiu quando um retrovírus não-transformante, como o vírus da leucose aviária (ALV) ou o vírus da leucemia murina (MLV), adquiriram um proto-oncogene a partir do genoma de uma célula hospedeira infectada. Na verdade, os vírus precursores “não-transformantes” também poderiam induzir câncer, mas apenas em uma escala de tempo muito mais extensa; geralmente passavam-se meses até que eles conseguissem produzir câncer. Os retrovírus que carregam oncogenes, em contraposição, em geral induzem tumores dentro de dias ou semanas após terem sido injetados em animais hospedeiros.

Quando os retrovírus de rápida transformação eram usados para infectar células em cultura, estas geralmente respondiam por alterações morfológicas e de comportamento do crescimento que tipificam o comportamento de células cancerígenas (veja a Tabela 3.2). Em contraste, quando os vírus tumorigênicos lentos, como ALV e MLV, infectavam células, estas liberavam uma progênie de partículas virais, mas sem apresentar qualquer mudança aparente no formato e no comportamento do crescimento. Essa falta de mudanças nos fenótipos celulares foi consistente com o fato de que tais vírus careciam de oncogenes em seus genomas.

Esses fatos, quando agrupados, representavam um grande quebra-cabeça. Como os vírus como MLV ou ALV poderiam induzir uma malignidade se não portavam oncogenes? Em 1981, o quebra-cabeça foi resolvido.

A solução surgiu do estudo das leucemias que ALV induzia em galinha, mais especificamente da análise detalhada dos DNAs genômicos das células leucêmicas. Invariavelmente, essas células carregavam cópias do pró-vírus ALV integradas em seus genomas. Alguns pesquisadores direcionaram esforços para mapear os sítios no DNA cromossômico em que o pró-vírus ALV havia se integrado. Quando esses experimentos começaram, uma década após a descoberta de Temin e Baltimore, já havia tornado-se claro que a integração de pró-vírus ocorre em sítios aleatórios ao longo do DNA cromossomal de células hospedeiras infectadas. Dado o tamanho do genoma de galinha, pode haver muitos milhões de sítios cromossômicos distintos utilizados por ALV para integrar seu pró-vírus.

Mas análises moleculares de uma série de leucemias induzidas por ALV, cada uma surgindo independentemente em galinhas diferentes, revelou uma grande surpresa. Em uma substancial porção (> 80%) desses genomas de células leucêmicas, o pró-vírus ALV mostrou-se integrado ao DNA cromossomal imediatamente adjacente ao proto-oncogene *c-myc* (Figura 3.23)! Tal observação, por si só, foi difícil de ser considerada devido à noção de que a integração pró-viral ocorre aleatoriamente em milhões de sítios ao longo dos genomas de células infectadas.

Logo se tornou claro que a associação física próxima dos genomas virais integrados e o gene *myc* celular levaram a uma ligação funcional entre esses dois elementos genéticos. O promotor transcricional viral, aninhado dentro do pró-vírus ALV, interrompeu os mecanismos de controle que normalmente governavam a expressão do gene *c-myc* (veja a Figura 3.23). Agora, em vez de ser regulado por seu próprio promotor nativo, o gene celular *myc* foi colocado diretamente sob o controle transcricional viral. Como consequência, em vez de ser finamente regulado pelo circuito-controle da célula, a expressão de *c-myc* foi tomada por um usurpador estranho que dirigiu sua expressão para um constante e alto nível. Essencialmente, esse gene viral-celular híbrido que surgia nos cromossomos de células leucêmicas parecia estar funcionando de forma muito similar ao oncogene *v-myc* carregado pelo vírus da mielocitomatose aviária.

Repentinamente, todas as respostas necessárias para solucionar o quebra-cabeça da **leucemogênese** (formação de leucemia) por ALV caíram no lugar certo. A solução ocorreu da seguinte

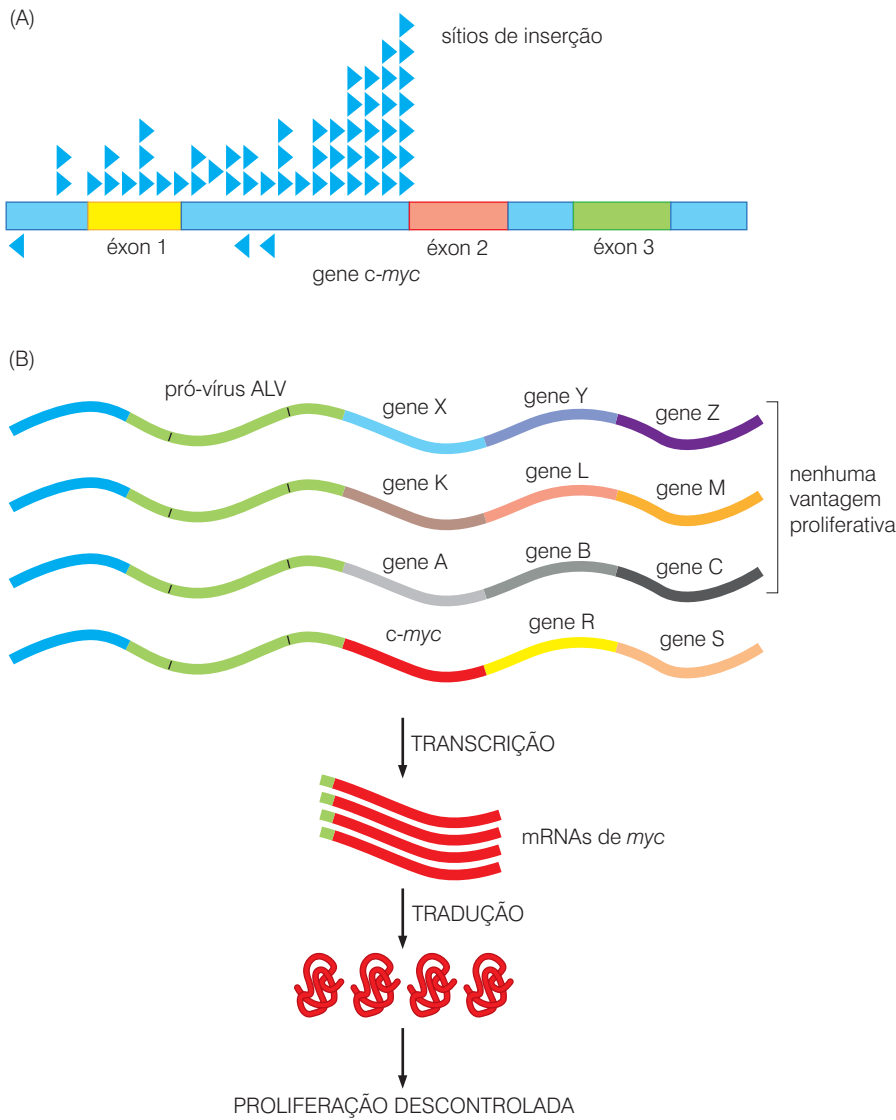


Figura 3.23 Mutagênese de inserção As ações oncogênicas de vírus, tais como vírus da leucose aviária (ALV), que carecem de oncogenes adquiridos, poderiam ser explicadas pela integração de seu DNA pró-viral adjacente a um proto-oncogene celular. (A) Análises de inúmeros linfomas de células B que foram induzidos por ALV revelaram que uma grande proporção dos pró-vírus ALV foram integrados no segmento de DNA cromossômico portando o proto-oncogene *c-myc*; a maioria estava integrada entre o primeiro éxon não-codificante de *c-myc* e o segundo éxon, no qual as fases de leitura de *myc* iniciam. Os sítios de integração estão aqui apresentados pelos triângulos *hachurados*. Como indicado, a maior parte (mas não todos) dos pró-vírus foram integrados na mesma orientação transcricional do gene *c-myc*. (B) Esse comportamento poderia ser racionalizado da seguinte forma: no curso de infecção de linfócitos de galinha por ALV, o pró-vírus ALV (*verde*) torna-se aleatoriamente integrado em milhões de sítios diferentes no DNA cromossômico dos linfócitos. Em raras ocasiões, um pró-vírus ALV torna-se integrado (ao acaso) no proto-oncogene *c-myc* (*vermelho*). Isso pode então fazer com que a transcrição do gene *c-myc* seja dirigida pela ação constitutiva forte do promotor de ALV. Uma vez que altos níveis da proteína Myc têm uma potente ação em dirigir a proliferação celular, a célula portando esse pró-vírus integrado e o gene *c-myc* ativado irá agora multiplicar-se de forma descontrolada, finalmente gerando muitos descendentes que constituirão um linfoma. (Adaptada de S.J. Flint, L.W. Enquist, R.M. Krug et al., *Principles of Virology*. Washington, DC: ASM Press, 2000.)

forma: durante o curso de infecção de uma galinha, ALV espalhou-se por milhares e depois milhões de células no sistema hematopoiético da ave. Em um curto espaço de tempo, a infecção foi tão eficiente que a ave tornou-se **virêmica**, ou seja, sua corrente sanguínea carregava altas concentrações de partículas virais.

Cada uma dessas dezenas de milhares de infecções resultou na inserção de um pró-vírus AVL em alguma localização aleatória no genoma de uma célula infectada. Em geral, essa integração do pró-vírus não tinha nenhum efeito na célula hospedeira infectada, a não ser forçar o hospedeiro a produzir um grande número de uma progênie de partículas virais. Mas em raras ocasiões, talvez uma entre 10 milhões de infecções, um pró-vírus, ao acaso próximo, tornou-se integrado ao gene *c-myc*. Esse raro evento levou a um desfecho inesperado – a conversão do gene *c-myc* em um potente oncogene. A célula carregando o gene *c-myc* desregulado começou então uma proliferação descontrolada, e, dentro de semanas, algumas das células progenitoras evoluíram para células cancerígenas mais agressivas que constituíam uma leucemia.

Esse cenário explica a cinética lenta com que tais leucemias surgem após uma infecção viral inicial de uma ave. Visto que a ativação do gene *c-myc* a partir da integração pró-

viral é um evento de baixa probabilidade, muitas semanas e muitos milhões de eventos de infecção são necessários para que haja o desencadeamento das anormalidades malignas. Esse mecanismo particular de ativação do proto-oncogene passou a ser chamado de **mutagênese por inserção**; ela também explica os poderes leucemogênicos de outros retrovírus de ação lenta, como o MLV. Até o presente, o estudo de infecções induzidas por retrovírus aviário e murino tem demonstrado eventos de integração próximos a mais de 25 proto-oncogenes celulares distintos. De fato, a mutagênese por inserção pode ser usada como uma estratégia poderosa para encontrar novos proto-oncogenes (Barra lateral 3.8).

A não-manifestação daqueles que descobriram que mutagênese por inserção era mais uma idéia provocativa: talvez fosse possível que carcinógenos não-virais pudessem chegar ao mesmo resultado final que ALV. Talvez esses outros carcinógenos, incluindo raios X e compostos mutagênicos, pudessem alterar proto-oncogenes celulares enquanto estes residiam em seus sítios normais nos cromossomos celulares. O resultado pode ser a desestabilização do controle de crescimento celular, da mesma forma como os eventos que levavam às leucemias induzidas por ALV.

3.12 Alguns retrovírus carregam oncogenes naturalmente

As descrições dos retrovírus providas neste capítulo indicam que existem essencialmente duas classes deles. Alguns, como ALV e MLV, não carregam nenhum oncogene, mas podem induzir tumores que aparecem apenas após um longo período de latência (i. e., muitas semanas), depois de uma infecção inicial de um animal hospedeiro. Outros vírus, como RSV, podem induzir câncer rapidamente (i. e., em dias ou algumas semanas), tendo adquirido um oncogene a partir de um proto-oncogene celular precursor.

Mas existe uma terceira classe de retrovírus que não se adequou a nenhum desses padrões. O vírus de leucemia de célula T humana (HTLV-I) infecta cerca de 1% dos habitantes de Kyushu, a ilha sul do Japão. Uma infecção endêmica também está presente, ainda que a uma baixa taxa, em algumas ilhas do Caribe. A duradoura infecção por HTLV-I acarreta um risco de 3 a 4% de desenvolvimento de leucemia de célula T em adultos, e o vírus parece ser mantido na população pelo leite materno, por transmissão da mãe para a criança.

Não há indicações, apesar dos extensivos exames moleculares, de que os sítios de integração do pró-vírus HTLV-I estejam agrupados em certas regiões cromossômicas. Consequentemente, parece pouco provável que HTLV-I use a mutagênese por inserção para induzir leucemias. Em vez disso, seus poderes leucemogênicos parecem ser rastreáveis em uma ou mais proteínas virais que são naturalmente codificadas pelo genoma viral. O mais bem-compreendido desses é o gene viral *tax*, cujo produto é responsável por ativar a transcrição de seqüências de DNA pró-virais, possibilitando, assim, a produção de uma progênie de genomas de RNA. Ao mesmo tempo, o produto do gene *tax* parece ativar a transcrição de dois genes celulares que especificam importantes proteínas estimuladoras de crescimento – IL-2 (interleucina-2) e GM-CSF (fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos). Esses “fatores de crescimento”, aos quais retornaremos no Capítulo 5, são liberados pelas células infectadas por vírus e prosseguem estimulando a proliferação de vários tipos de células hematopoiéticas. Enquanto tal proliferação induzida, por si só, não gera diretamente uma leucemia, parece que populações das células estimuladas por HTLV-I podem progredir, com uma frequência baixa e previsível, para gerar variantes que são de fato neoplásicas. Nessa instância, a expressão de certos oncogenes virais, principalmente *tax*, parece ser um componente intrínseco e essencial de um ciclo de replicação retroviral entre animais hospedeiros, em vez de ser apenas a consequência de acidentes genéticos raros que produzem genomas híbridos incomuns, como o genoma de RSV.

Barra lateral 3.8 Mutagênese por inserção descobre novos proto-oncogenes

Como foi descrito anteriormente (veja a Seção 3.10), a análise dos genomas de retrovírus de rápida transformação possibilitaram que investigadores identificassem um grande número de proto-oncogenes. O fenômeno de mutagênese por inserção, primeiramente descoberto a partir da inserção de um genoma de ALV adjacente ao proto-oncogene *c-myc*, ofereceu uma estratégia alternativa para revelar esses genes celulares. Assim, um pesquisador poderia estudar uma série de tumores em formação independente, todos tendo sido induzidos por um retrovírus, como ALV ou MLV, que sabidamente carecia do seu próprio oncogene. Mais especificamente, esse pesquisador poderia analisar as localizações das seqüências da célula hospedeira que ficam imediatamente adjacentes aos pró-vírus integrados no DNA cromossômico de células tumorais. A espe-

rança era de que os pró-vírus pudessem ser encontrados repetitivamente integrados próximos a um (possivelmente ainda desconhecido) gene celular cuja ativação era desencadeada pelo promotor transcricional do pró-vírus. O gene adjacente poderia ser facilmente clonado, visto que ele era marcado de maneira eficiente pelo DNA pro-viral proximamente ligado.

Os frutos iniciais dessa estratégia vieram do estudo de câncer mamário induzido pelo vírus de tumor mamário de camundongo (MMTV), outro retrovírus. Pesquisadores mapearam os sítios de integração dos pró-vírus MMTV nos genomas de cânceres mamários de camundongo que haviam sido induzidos por esse vírus. A maioria dos pró-vírus foi encontrada integrada em uma de três localizações genômicas alternativas, agrupadas próximas a genes celulares que passaram então a ser chamados de *int-1*, *int-2* e *int-3* (Tabela 3.4). Posteriormente foi descoberto que cada um desses genes

codifica para uma proteína envolvida na estimulação de proliferação celular de uma forma ou de outra. A expressão desregulada de cada um deles, resultante da integração pró-viral de MMTV próxima, pareceu ser responsável por desencadear a proliferação celular que levou ao surgimento de tumores mamários.

O gene *int-1*, que revelou ser homólogo ao gene *wingless* de *Drosophila*, foi renomeado *Wnt-1*, e foi o precursor de toda uma série de genes *Wnt* que têm provado ser importantes mitógenos e **morfógenos**, ou seja, fatores importantes para o controle da morfogênese. Mais recentemente, essa estratégia de busca tem sido usada para descobrir um grande grupo de outros genes celulares; cada qual, quando ativado por mutagênese por inserção mediada por MLV, desencadeia leucemias em camundongos (Tabela 3.4).

Tabela 3.4 Exemplos de genes celulares que são ativados por mutagênese por inserção

Gene	Mutágeno de inserção	Tipo de tumor	Espécies	Tipo de oncoproteína
<i>myc</i>	ALV	linfoma de célula B	galinha	fator de transcrição
<i>myc</i>	ALV, FeLV	linfoma de célula T	galinha, gato	fator de transcrição
<i>nov</i>	ALV	nefroblastoma	galinha	fator de crescimento
<i>erbB</i>	ALV	eritroblastose	galinha	receptor de TK
<i>mos</i>	IAP	plasmacitoma	camundongo	cinase ser/thr
<i>int-1^a</i>	MMTV	carcinoma mamário	camundongo	fator de crescimento
<i>int-2^b</i>	MMTV	carcinoma mamário	camundongo	fator de crescimento
<i>int-3</i>	MMTV	carcinoma mamário	camundongo	receptor ^c
<i>int-H/int-5</i>	MMTV	carcinoma mamário	camundongo	enzima ^d
<i>pim-1</i>	Mo-MLV	linfoma de célula T	camundongo	cinase ser/thr
<i>pim-2</i>	Mo-MLV	linfoma de célula B	camundongo	cinase ser/thr
<i>bmi-1</i>	Mo-MLV	linfoma de célula T	camundongo	repressor transcricional
<i>tpl-2</i>	Mo-MLV	linfoma de célula T	camundongo	TK não-receptor
<i>lck</i>	Mo-MLV	linfoma de célula T	camundongo	TK não-receptor
<i>p53</i>	Mo-MLV	linfoma de célula T	camundongo	fator de transcrição
<i>GM-CSF</i>	IAP	leucemia mielomonocítica	camundongo	fator de crescimento
<i>IL2</i>	GalV	linfoma de célula T	macaco gibão	citocina ^e
<i>IL3</i>	IAP	linfoma de célula T	camundongo	citocina
<i>K-ras</i>	F-MLV	linfoma de célula T	camundongo	proteína G pequena
<i>CycD1</i>	F-MLV	linfoma de célula T	camundongo	ciclina G1
<i>CycD2</i>	Mo-MLV	linfoma de célula T	camundongo	ciclina G1

ALV = vírus da leucose aviária; FeLV = vírus da leucemia felina; F-MLV = vírus da leucemia murina de Friend; GalV = vírus da leucemia de macaco gibão; GF = fator de crescimento; IAP = partícula A intracisternal (um genoma semelhante ao retroviral que é endógeno a células); Mo-MLV = vírus da leucemia murina de Moloney; MMTV = vírus de tumor mamário de camundongo; ser/thr = serina/treonina; TK = tirosina cinase.

^aSubseqüentemente renomeada *Wnt-1*.

^bSubseqüentemente identificado como um gene que codifica um fator de crescimento de fibroblasto (FGF).

^cRelacionado a receptores *notch*.

^dEnzima que converte androgênios em estrogênios.

^eCitocinas são GFs que regulam consideravelmente vários tipos de células hematopoiéticas.

Adaptada, em parte, de J. Butel, *Carcinogenesis* 21: 405-426, 2000; e de N. Rosenberg and Jolicoeur, em J.M. Coffin, S.H. Hughes and H.E. Varmus (eds.), *Retroviruses*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997. Também, em parte, de G.M. Cooper, *Oncogenes*, 2ed. Boston: Jones and Barlett Publishers, 1995.

3.13 Sinopse e perspectivas

Ao estudar tumores em animais de laboratório e domesticados, biólogos em câncer descobriram um grande espectro de vírus causadores de câncer durante o século XX. Muitos desses vírus, tendo tanto genomas de DNA como de RNA, revelaram-se capazes de infectar células em cultura e transformá-las em células tumorogênicas. Tais poderes transformantes indicavam a presença de oncogenes poderosos nos genomas dos vírus; na verdade, oncogenes potentes o suficiente para induzir vários dos fenótipos associados a células cancerígenas (veja a Tabela 3.2). Além disso, a habilidade desses vírus em criar células transformadas na placa de cultura permitiu uma melhor compreensão dos mecanismos pelos quais eles poderiam induzir câncer nos tecidos de animais hospedeiros infectados.

Uma grande revolução conceitual veio do detalhado estudo dos vírus tumorais de RNA, mais especificamente o vírus do sarcoma de Rous (RSV). Seu oncogene, denominado *v-src*, parece ter originado, em um gene celular normal, *c-src*. Essa descoberta revelou a habilidade de retrovírus tumorogênicos lentos, não-transformantes, como ALV (vírus da leucose aviária), em adquirir genes celulares normais e convertê-los em oncogenes potencialmente transformantes. Os vírus híbridos que surgiram posteriormente a essas aquisições genéticas eram agora capazes de induzir tumores rapidamente em hospedeiros infectados.

Ainda mais importantes foram as implicações de encontrar o gene *c-src*. Sua presença em um genoma celular normal demonstrava que o genoma celular carrega um proto-oncogene que pode ser convertido em um oncogene seguido de alterações nas seqüências do gene normal. (Os detalhes dessas alterações serão descritos nos próximos capítulos.) Logo descobriu-se que um grande número de retrovírus de origem tanto aviária quanto de mamíferos carregava outros oncogenes que tinham sido adquiridos de forma similar aos genomas de células infectadas. Enquanto cada um desses proto-oncogenes era inicialmente encontrado no genoma de uma ou outra espécie de vertebrado, agora sabemos que todos eles estão representados nos genomas de todos os vertebrados. Como consequência, o genoma genérico de vertebrados carrega dúzias de tais genes normais, cada qual com um potencial de ser convertido em um oncogene ativo.

Ainda outros proto-oncogenes foram descobertos ao se estudar os sítios de integração de pró-vírus nos genomas de tumores que haviam sido induzidos por retrovírus não-transformantes, como vírus da leucemia murina (MLV) e ALV. A integração aleatória desses pró-vírus ao DNA cromossômico produz, ocasionalmente, a partir do processo de mutagênese por inserção, a conversão de um proto-oncogene em um oncogene ativado que pode ser facilmente isolado devido a sua ligação próxima ao pró-vírus. Em muitas ocasiões, a mutagênese por inserção levou ao redescobrimento de um proto-oncogene que já era conhecido devido a sua presença em um retrovírus muito transformante; *myc* e o vírus da mielocitomatose aviária (AMV) exemplificam essa situação. Em outras ocasiões, proto-oncogenes verdadeiramente novos foram descobertos a partir do estudo de sítios de integração do pró-vírus; o gene *int-1* ativado por MMTV fornece um ótimo exemplo dessa rota de descobrimento. Na verdade, o processo de mutagênese por inserção permaneceu nada mais que uma curiosidade laboratorial, de interesse apenas a um pequeno e seletivo grupo de biólogos em câncer, até ser reportado por induzir tumores em muitos pacientes em tratamento por terapia gênica (Barra lateral 3.9).

Essas descobertas de proto-oncogenes e oncogenes, profundas como de fato foram, levantaram tanto questionamentos quanto respostas. Mas permaneceu obscuro como as proteínas oncogênicas codificadas pelo retrovírus (chamadas **oncoproteínas**) diferiam funcionalmente das proteínas codificadas pelos proto-oncogenes correspondentes. Os mecanismos bioquímicos utilizados por essas oncoproteínas para transformar células também eram obscuros.

Barra lateral 3.9 Terapia gênica pode ocasionalmente ter consequências trágicas A terapia gênica tem mostrado grande aplicabilidade em doenças do sistema hematopoiético. Portanto, crianças nascidas com uma imunodeficiência grave decorrente de um defeito específico na linhagem germinativa em um ou outro componente crítico do sistema imune podem, em princípio, ser curadas se o gene ausente é transduzido em suas células-tronco da medula óssea utilizando vetores retrovirais (veja Barra lateral 3.7). Após a infecção *in vitro* por um vetor retroviral transdutor de genes, células-tronco são introduzidas nas crianças acometidas, em cuja medula óssea tornam-se estáveis. A progênie diferenciada dessas células-tronco enxertadas e geneticamente alteradas é então capaz de suprir as funções imunológicas ausentes, revertendo, assim, a imunodeficiência congênita.

Essa abordagem terapêutica foi criada na França, onde células-tronco de medula óssea de dez crianças que sofriam de imunodeficiência congênita – imunodeficiência grave combinada ligada ao X – foram infectadas com o vetor retroviral derivado do vírus da leucemia murina de Moloney (MLV), o qual transduziu um gene que especifica o produto gênico que elas não possuíam – a proteína γ c. Nove dentre elas responderam pela apresentação de uma dramática reconstituição de sua função imunológica. Entretanto, como foi reportando em 2003, as duas crianças mais jovens do teste desenvolveram leucemia de células T após 30 e 34 meses do início dos testes de terapia gênica. Um terceiro caso foi posteriormente reportado.

Nesses casos, análises do DNA de células leucêmicas revelaram pró-vírus derivados de vetores virais que haviam se tornado integrados entre alguns pares de quilobases do primeiro éxon do gene *LMO2*, um proto-oncogene que era previamente conhecido por ser ativado em leucemias de células T humanas. Dado o conhecido papel do oncogene *LMO2* em leucemogênese, esses pró-vírus inseridos são, quase que certamente, responsáveis por desencadear as três leucemias. Assim, a mutagênese por inserção que leva à oncogênese, que por muito tempo foi temida como um possível, mas remoto, risco ocasionado por tal estratégia de terapia gênica, tornou-se uma realidade amarga e pode, em último caso, limitar as opções disponíveis àqueles interessados em corrigir defeitos de nascença a partir de terapia gênica.

Os mecanismos moleculares usados por vírus tumorais de DNA para transformar células infectadas eram ainda mais ilusórios, visto que esses vírus pareciam especificar oncoproteínas que eram muito diferentes das proteínas produzidas por suas células hospedeiras. Tais diferenças sugeriram que essas oncoproteínas virais não poderiam se apresentar à maquinaria de regulação do crescimento celular de uma forma fácil e óbvia. Foi somente na metade dos anos 1980, dez anos após o início dessa pesquisa, que seus mecanismos de transformação tornaram-se aparentes, como veremos nos Capítulos 8 e 9.

Para muito pesquisadores em câncer, e para o público que apóia essa pesquisa, havia um único assunto excedente que motivou muito deste trabalho em primeiro lugar: algum desses vírus e os proto-oncogenes que eles ativavam desempenhavam papéis-chave em causar câncer em humanos? Como aprenderemos, cerca de um quinto da incidência mundial de câncer em humanos está associada a agentes infecciosos. O vírus da Hepatite B e C (HBV e HCV), assim como os papilomavírus humano (HPVs), desempenham papéis-chave em desencadear cânceres de ocorrência comum. De fato, mesmo tumores humanos de ocorrência não frequente que parecem ser familiares têm sido associados, nos últimos anos, a infecções virais (Barra lateral 3.10). Então, o reconhecido papel dos vírus na patogênese do câncer é substancial e cada vez maior.

Além disso, mesmo que vírus tumorais de RNA e DNA não tenham sido responsáveis por incitar um único caso de câncer humano, a investida em tentar elucidar os mecanismos de transformação teria sido justificada. Essa pesquisa abriu a cortina para os genes no nosso genoma que desempenham papéis centrais em todos os tipos de câncer humanos. Isso acelerou em décadas nossa compreensão sobre a patogênese do câncer ao nível de genes e moléculas, o que lançou a pesquisa em câncer de uma ciência descritiva para uma ciência em que fenômenos complexos poderiam ser finalmente compreendidos e explicados em termos mecanicistas precisos.

Barra lateral 3.10 O sarcoma clássico de Kaposi aparenta ser uma doença familiar. Algumas malignidades induzidas por vírus estão consideravelmente limitadas a pequenas subpopulações e, portanto, assemelham-se a síndromes de câncer em família. Encontraremos muitas dessas síndromes nos Capítulos 7, 8, 9 e 12, em que aprenderemos que a herança de alelos mutantes de genes supressores de tumor ou genes reparadores de DNA pode criar uma forte predisposição ao câncer congênito.

Anteriormente ao estabelecimento da epidemia de AIDS, a doença de sarcoma de Kaposi (KS) – aparentemente uma malignidade de células relacionadas àquelas que formam o revestimento endotelial de ductos linfáticos – encontrava-se limitada a pequenas subpopulações, principalmente entre homens do Mediterrâneo e de descendência judaica. Isso se assemelhava a um câncer familiar, em que alelos de predisposição ao câncer estavam presentes apenas em conjuntos de genes de certas subpopulações étnicas. Após o estabelecimento da epidemia de AIDS, entretanto, KS tornou-se mil vezes mais comum, e, ao menos esta forma de KS poderia ser associada a um agente infeccioso – herpesvírus-8 humano (HHV-8), também conhecido como KSHV (herpesvírus KS). Este vírus, junto com uma série de outros agentes infecciosos, é um patógeno oportunista que tem sucesso nos corpos daqueles que carecem de um sistema imune funcional. E por causa da epidemia de AIDS na África, KS tornou-se agora a quarta mais comum infecção indutora de câncer no mundo.

A virologia de HHV-8 falhou em explicar como o KS pré-AIDS “clássico” é transmitido em populações imunocompetentes. De fato, esses tumores poderiam também estar associados a infecções por HHV-8. O exame das várias sublinhagens de HHV-8, definidas por polimorfismos de sequência nos DNAs virais, tem recentemente revelado que diferentes sublinhagens do vírus estão presentes em diferentes subpopulações de judeus; uma sublinhagem predomina entre Judeus Ashkenazic (de descendência Européia recente), enquanto uma segunda é comum entre judeus Sephardic (descendência norte e centro-leste africana). Ambas as populações têm taxas de infecção que chegam a ser 10

a 20 vezes mais altas do que em populações do oeste não-aidéticas. Provocativamente, entre esses subgrupos, a transmissão de sublinhagens específicas de HHV-8 está muito mais fortemente correlacionada com a herança de certos polimorfismos de DNA mitocondrial do que com a herança de marcadores polimórficos do cromossomo Y. O DNA mitocondrial é transmitido maternamente, indicando que a transmissão maternal de vírus (provavelmente ocorrendo através da saliva) tem desempenhado um papel majoritário em criar bolsões da doença em linhagens familiares que provavelmente se estendem de volta até populações fundadoras que existiram há mais de 2 mil anos. (Outra via de transmissão materna pode explicar a alta incidência de leucemia de célula T em adultos [causada pelo retrovírus HTLV-1] no sul do Japão [veja a Seção 3.12].)

Assim, algumas malignidades geográfica e etnicamente localizadas, como KS clássica e leucemia de células T de adultos, são, na verdade, decorrentes de vírus que se disseminam fracamente “horizontalmente” (ou seja, de um adulto para outro), mas podem ser transmitidas “verticalmente” (entre pais e prole) por meio de contato íntimo a longo prazo. Isso reflete o comportamento de certas linhagens de camundongo que têm altos índices de câncer mamário. Como foi apresentado primeiramente em Bar Harbour, Maine, em 1933, a transmissão da doença de pais para a prole ocorreu quando fêmeas de linhagens de alta incidência eram cruzadas com machos de linhagens de baixa incidência, mas não após o cruzamento reverso. Além disso, quando filhotes de fêmeas de linhagens de alta incidência eram transferidos para mães adotivas em lactação de baixa incidência dentro de 24 horas após o nascimento, apenas 8% finalmente desenvolveram câncer mamário, comparado com uma incidência de 92% exibida por camundongos que haviam sido cuidados por mães de uma linhagem de alta incidência. Isso levou à conclusão de que essa suscetibilidade ao câncer de mama era transmitida de uma geração a outra por um agente infeccioso no leite materno, que foi posteriormente identificado como sendo o vírus de tumor mamário de camundongos (MMTV).

Conceitos-chave

- A noção de que câncer pode ser uma doença infecciosa foi reforçada com a descoberta de Peyton Rous, em 1910, de que um vírus – o vírus do sarcoma de Rous (RSV) – poderia induzir tumores em galinhas, mas a idéia perdeu credibilidade em 1926, quando as lesões estomacais dos ratos de Fibiger foram atribuídas como resultantes de deficiência de vitamina, e não de infecção por espiroquetas.
- Décadas mais tarde, a descoberta de Howard Temin e Harry Rubin de que culturas celulares infectadas com RSV eram transformadas em células tumorais ressuscitou a pesquisa com vírus tumorais e levou à concretização de que câncer poderia ser estudado ao nível celular.
- Células transformadas em cultura apresentam uma série de características: (1) diferente de células normais, células transformadas não possuem inibição por contato e, como consequência, manifestam-se como uma massa de multicamadas conhecida como um foco; e (2) o foco é um crescimento clonal, com todas suas células descendentes de um único progenitor comum. (3) As células em um foco em geral podem crescer de forma independente de ancoragem.
- Tumorigenicidade em um hospedeiro animal é o teste final para transformação celular completa.
- O fenótipo transformante induzido pela infecção por RSV foi identificado como sendo transmitido à progênie celular, e experimentos utilizando um mutante de RSV sensível à temperatura (*ts*) mostrou que a retenção do estado transformante depende da atividade continuada de um produto gênico de RSV.

- Em adição aos vírus de RNA como RSV, várias classes de vírus de DNA – incluindo papovavírus, adenovírus humano, herpesvírus e poxvírus – foram identificados por induzir câncer.
- Enquanto os genomas de vírus de RNA consistem em RNA de fita simples, os genomas de vírus de DNA consistem em DNA dupla fita (dsDNA). Os papovavírus – que incluem o papilomavírus de Shope, o poliomavírus de camundongo e o SV40 – têm dsDNA genômicos circulares, enquanto adenovírus e herpesvírus têm longos dsDNA genômicos lineares. Da mesma forma que SV40, o adenovírus humano induz lise celular após replicar-se em seu hospedeiro permissivo natural, mas não consegue replicar-se em células hospedeiras não-permissivas e, em lugar disso, pode transformar essas células.
- Uma vez que a replicação de genomas virais de DNA ocorre independentemente do DNA da célula hospedeira e já que os genomas virais carecem de elementos para uma segregação apropriada durante a mitose, a transmissão de genomas de vírus tumorais de DNA de uma geração celular para a próxima representou um problema conceitual, até se descobrir que os genomas de vírus tumorais de DNA se integram no DNA cromossomal de células hospedeiras.
- Já que os genomas de vírus de RNA consistem em RNA de fita simples que não pode ser incorporado no DNA do hospedeiro e a reinfeção não explica a persistência do estado transformante nas células descendentes, Temin postulou que vírus de RNA fazem cópias de DNA dupla fita de seus genomas – o até então fantástico processo da transcrição reversa – e que essas cópias de DNA são integradas no DNA cromossomal do hospedeiro como uma parte de um ciclo de replicação viral normal. Essa é a principal distinção dos vírus tumorais de DNA, para os quais a integração é um evento muito raro e casual, que não é uma parte integral da replicação viral.
- Visto que seus ciclos de replicação dependem da informação fluindo de forma inversa (ou seja, de RNA para DNA), vírus de RNA passaram a ser chamados de retrovírus, e a versão de DNA de seus genomas virais passou a ser chamada de pró-vírus.
- Trabalhando com RSV, pesquisadores descobriram que a replicação viral e a transformação celular eram especificadas por genes diferentes, com a função transformante residindo em um único gene, denominado *src*.
- Usando uma sonda de DNA que reconhece especificamente as seqüências do genoma de RSV associadas à transformação (i. e., *src*), pesquisadores fizeram uma descoberta inesperada, de que as seqüências relacionadas a *src* estavam presentes no DNA de células de galinha não-infectadas por RSV. A intensificação desses estudos indicou que o gene *src* era um gene normal, altamente conservado, de todas as espécies de vertebrados (como foi posteriormente comprovado para muitos outros genes).
- A diferença entre as ações da versão celular de *src* (*c-src*), que comporta funções celulares normais, e da versão viral (*v-src*), que atua como um oncogene, poderia ser explicada se *v-src* fosse alterado após ser arrancado de um genoma celular por um ancestral de RSV.
- Uma vez que ele pode servir como um precursor para um oncogene, *c-src* foi chamado de proto-oncogene, um termo que carregava as implicações que células normais de vertebrados contêm genes que têm o potencial intrínseco de induzir câncer.
- A aquisição e ativação de *src* por um retrovírus indicou que um único oncogene poderia atuar pleiotropicamente para evocar uma multiplicidade de mudanças nas características celulares, assim como a possibilidade de que outros mecanismos de mutação possam ativar proto-oncogenes que continuavam a residir em seus sítios normais nos cromossomos celulares.
- Alguns retrovírus podem induzir câncer apesar de não carregarem oncogenes em seus genomas; esses vírus funcionam muito mais lentamente em induzir câncer do que aqueles que carregam oncogenes. Tais retrovírus não-transformantes de lenta tumorigenicidade ativam proto-oncogenes ao inserir seus genomas adjacentes a esses genes celulares em cromossomos celulares, um processo denominado mutagênese por inserção. Esse evento ao acaso coloca o proto-oncogene sob o controle do promotor transcricional viral, que desregula a expressão do gene e leva à proliferação celular descontrolada. A mutagênese por inserção pode ser explorada para encontrar novos proto-oncogenes.

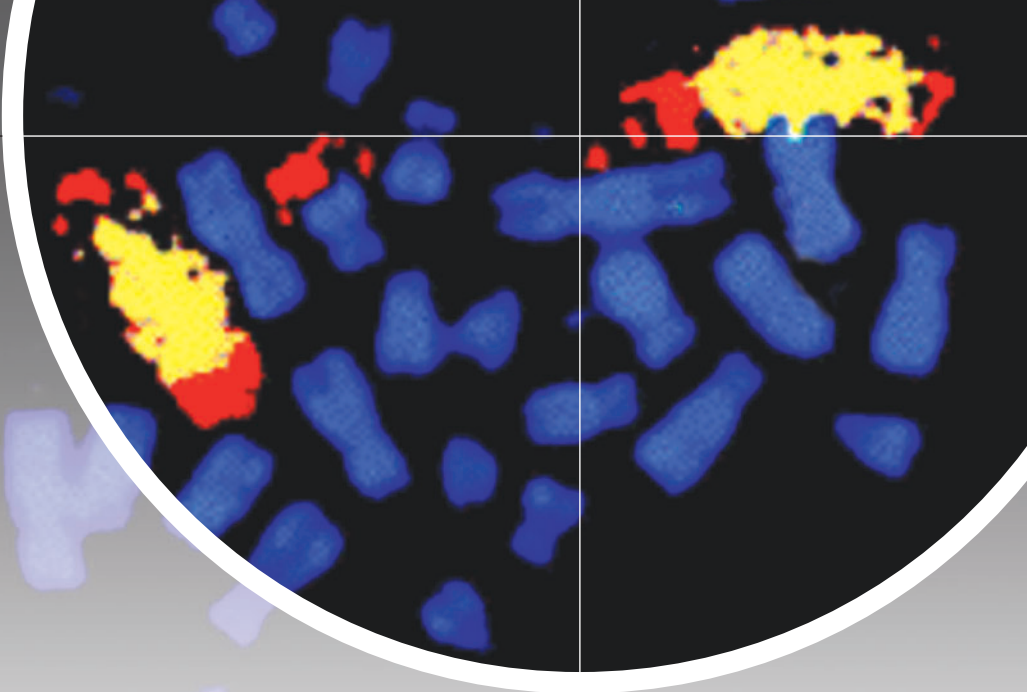
- Em adição aos retrovírus não-transformantes (que funcionam via mutagênese por inserção) e aos de transformação pontual (que funcionam via oncogenes adquiridos), existem retrovírus cujos poderes carcinogênicos são rastreáveis nos seus próprios produtos gênicos normais. Um desses casos é o vírus da leucemia de célula T humano (HTLV-I), cujo gene *tax* codifica uma proteína que ativa a transcrição de DNA pró-viral e, como efeito colateral, também estimula a expressão de fatores de crescimento celular que induzem proliferação celular.

Questões elaboradas

1. Que observações favorecem ou argumentam contra a noção de que câncer é uma doença infecciosa?
2. Como se pode provar que genomas de vírus tumorais devem estar presentes para manter o estado transformante de um tumor induzido por vírus? Que mecanismos genéticos, você imagina, podem permitir que esse processo torne-se “bate-e-corre”, em que a presença contínua de um vírus tumoral não é necessária para manter o fenótipo tumorogênico após um certo tempo?
3. Por que os vírus que carregam oncogenes, como o vírus do sarcoma de Rous, são tão raramente encontrados em populações selvagens de galinhas?
4. Que evidência sugere que os fenótipos de células transformadas por vírus tumorais *in vitro* refletem fenótipos comparáveis aos de células tumorais *in vivo*?
5. Que lógica sugere que a integração cromossomal de genomas de vírus tumorais seja uma parte intrínseca obrigatória do ciclo de replicação de vírus tumorais de RNA, mas um produto secundário descuidado da replicação de vírus tumorais de DNA?
6. Que evidência sugere que um proto-oncogene como *src* seja, na verdade, um gene celular normal em vez de um gene que foi inserido em uma linhagem germinativa por um retrovírus infectante?
7. Como você imagina que vírus tumorais de DNA e retrovírus como vírus da leucose aviária surgiram no passado evolutivo distante?
8. Porque os retrovírus, como o vírus da leucose aviária, levam tanto tempo para induzir câncer?

Leitura adicional

- Bishop JM (1985) Viral oncoproteins. *Cell* 42, 23-38.
- Boshoff C (2004) Kaposi virus scores cancer coup. *Nat. Med.* 9, 261-262.
- Bruix J et al., (2004) Focus on hepatocellular carcinoma. *Cancer Cell* 5, 215-219.
- Bute J (2000) Viral carcinogenesis: revelation of molecular mechanisms and etiology of human disease. *Carcinogenesis* 21, 405-426.
- Carbone M, Pass HI, Miele L and Bocchetta M (2003) New developments about the association of SV40 with human mesothelioma. *Oncogene* 22, 5173-5180.
- Coffin JM, Hughes SH and Varmus HE (eds.) (1997) Retroviruses. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Evans AS and Mueller NE (1990) Viruses and cancer: causal associations. *Ann. Epidemiol.* 1, 71-92.
- Fields BN, Knipe DM, Howley PM et al. (eds.) (1996) Field's Virology, 3rd ed. Philadelphia: Lippincott-Raven.
- Flint SJ, Enquist LW, Krug RM et al. (2000) Principles of Virology. Washington, DC: ASM Press.
- Kung HJ, Boerkoel C and Cater TH (1991) Retroviral mutagenesis of cellular oncogenes: a review with insights into the mechanisms of insertional activation. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 171, 1-15.
- López-Rio F, Illei PB, Rusch V and Ladanyi M (2004) Evidence against a role for SV40 infection in human mesotheliomas and high-risk, false-positive PCR results owing to presence of SV40 sequences in common laboratory plasmids. *Lancet* 364, 1157-1166.
- Newton R, Beral V and Weiss R (1999) Human immunodeficiency virus infection and cancer. *Cancer Surv.* 33, 237-262.
- Parsonnet J (ed.) (1999) Microbes and Malignancy: Infection as a Cause of Human Cancers. London, UK: Oxford University Press.
- Phillips AC and Vousden KH (1999) Human papillomavirus and cancer: the viral transforming genes. *Cancer Surv.* 33, 55-74.
- Stehelin D, Varmus HE, Bishop JM and Vogt PK (1976) DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA. *Nature* 260, 170-173.
- Weiss R, Teich N, Varmus H and Coffin J (eds.) (1985) Molecular biology of tumor viruses: RNA tumor viruses, 2nd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- zur Hausen H (1991) Viruses in human cancers. *Science* 254, 1167-1173.



CAPÍTULO 4

Oncogenes Celulares

“A origem viral da maioria de todos os tumores malignos... foi agora documentada além de qualquer dúvida aceitável. Seria um tanto difícil admitir uma etiologia diferente para os tumores humanos.”

Ludwik Gross, virologista de tumores, 1970

O DNA e o RNA dos vírus de tumores caracterizados nos anos 1970 forneceram aos biólogos do câncer uma teoria simples e poderosa de como os tumores humanos poderiam surgir. Os vírus que ocorreram comumente na população humana poderiam, com alguma frequência, infectar tecidos suscetíveis e causar a transformação das células infectadas. Estas, por sua vez, começariam a se multiplicar e, mais cedo ou mais tarde, formar grandes massas de células – que foram frequentemente encontradas na clínica oncológica. Uma vez que os vírus de tumores tiveram sucesso em transformar células normais de roedores e galinhas em células tumorais com apenas um pequeno número de genes introduzidos, eles poderiam ter forças similares para transformar células humanas também.

Com o passar do tempo, esse enredo, atrativo como estava, ficou cada vez mais difícil de ser conciliado com a biologia e a epidemiologia do câncer de humanos. A maioria dos tipos de câncer humano claramente não se espalha de um indivíduo para outro como uma doença infecciosa. Agrupamentos significativos de casos de câncer – miniepidemias da doença – são difíceis de encontrar. Ainda, mais importante, tentativas realizadas durante os anos 1970 para isolar os vírus da maioria dos tipos de tumores humanos não tiveram sucesso. Das centenas de tipos de tumores encontrados na clínica oncológica, apenas dois tipos que ocorrem em geral no mundo ocidental – carcinomas cervicais e **hepatomas** (carcinomas do fígado) – puderam ser claramente amarrados a agentes virais causadores, específicos.

Essas realizações evocaram duas respostas. Aqueles que estavam apoiados tenazmente aos vírus de tumores como agentes causadores de todos os cânceres humanos argumentaram que os carcinógenos químicos e físicos interagem com os vírus que normalmente se escondem dentro das células do corpo, ativando o seu poder latente causador de câncer. Outros pesqui-

sadores responderam eliminando os vírus inteiramente e começaram a olhar para uma outra fonte em potencial de genes responsáveis pelo câncer humano – o genoma da célula com suas dezenas de milhares de genes. A segunda direção finalmente triunfou, e, pelo final dos anos 1980, o genoma da célula foi reconhecido por ser uma fonte rica dos genes que conduzem à proliferação de células do câncer humano. Assim, os vírus de tumores, uma vez vistos como os agentes-chave desencadeadores de todos os cânceres humanos, não sobreviveram a essas grandes expectativas. Entretanto, ironicamente, a pesquisa com vírus de tumores provou ser muito importante na descoberta de genes celulares que certamente são responsáveis pelo fenótipo celular neoplásico. O amplo catálogo de genes celulares causadores de câncer montado durante as décadas seguintes – oncogenes e genes supressores de tumores – deriva diretamente desses esforços anteriores para encontrar agentes infecciosos causadores de câncer nas populações humanas.

4.1 Os cânceres podem ser desencadeados pela ativação de retrovírus endógenos?

A pesquisa iniciada no Japão por Katsusaburo Yamagiwa, na primeira década do século XX, revelou que agentes químicos poderiam induzir câncer em animais de laboratório (veja a Seção 2.8). Como mencionado anteriormente, o seu trabalho mostrou que a pintura repetida com piche de carvão nas orelhas de coelhos gerou carcinomas de pele após alguns meses. Pela metade da década seguinte, uma tese de Ph.D. em Paris documentou mais de uma centena de casos de câncer humano, a maioria de pele, em indivíduos que trabalharam com tubos de raio X. Em ambos os casos, ficou claro que os agentes que provocaram diretamente os tumores não eram biológicos, sendo compostos orgânicos ou radiação (veja as Seções 2.8 e 2.9).

Tais descobertas eram bem-conhecidas por todos os pesquisadores de câncer na metade do século XX e foi difícil conciliá-las com a teoria de que todos os cânceres são ativados de uma maneira ou outra pela ação de agentes infecciosos, ou seja, vírus de tumores. Então, alguns seguidores da teoria viral do câncer, especialmente aqueles que trabalhavam com retrovírus, propuseram um novo mecanismo, no início dos anos 1970. O seu modelo explicou como os vírus de tumores poderiam participar da formação dos vários cânceres que não tinham sinais externos de infecção viral.

Esse novo esquema derivou da biologia peculiar dos retrovírus. Na ocasião, genomas de retrovírus se integraram aos cromossomos da linhagem germinal de várias espécies de vertebrados, e os pro-vírus resultantes eram então transmitidos como alelos mendelianos de uma geração para outra (Barra lateral 4.1). Em geral, esses pró-vírus endógenos são transcricionalmente silenciosos, e a sua presença em todas as células de um organismo não é aparente. Entretanto, em raras ocasiões, é possível despertar a expressão de um destes pró-vírus endógenos latentes, que freqüentemente mantêm a capacidade de codificar para partículas retrovirais infecciosas.

A ativação do genoma de um retrovírus endógeno (ERV) em fibroblastos preparados a partir de certas cepas de camundongo pode ser realizada cultivando tais células na presença do análogo de timidina bromodeoxiuridina (BrdU). Em resposta, essas células do tecido conjuntivo, que evidentemente são livres de infecção retroviral, de repente começam a liberar partículas de retrovírus, devido à desrepressão transcricional do seu, em geral silencioso, pró-vírus endógeno. De maneira similar, pró-vírus endógenos latentes podem ser ativados espontaneamente *in vivo* em um número pequeno de células em um camundongo. Uma vez que partículas virais infecciosas são liberadas de algumas dessas células, elas podem se multiplicar pela infecção célula-a-célula, se espalhar rapidamente pelo corpo e induzir leucemias nesses animais.

Conhecendo esse comportamento dos retrovírus endógenos, alguns suspeitaram que os cânceres humanos pudessem ter-se originado de um modo similar. Por exemplo, carcinógenos

mutagênicos, como aqueles presentes no piche de tabaco, poderiam provocar a ativação de retrovírus endógenos latentes. As partículas virais resultantes começariam então a multiplicação, espalhando-se pelo corpo de um indivíduo, e, como os retrovírus endógenos em algumas linhagens de camundongos, levariam à formação de câncer em um ou outro tecido suscetível. Ao mesmo tempo, enquanto são capazes de se espalhar pelos tecidos das pessoas, esses vírus endógenos poderiam ser incapazes de se espalhar horizontalmente para um outro indivíduo, explicando as repetidas observações de que o câncer não se comporta como uma doença transmissível. Um outro esquema relacionado postulou que retrovírus inseriram oncogenes virais nas linhagens germinais de várias espécies, os quais foram ativados por vários tipos de carcinógenos.

Enquanto atrativos no conceito, esses modelos de causas de câncer humano logo desmoronaram, pois evidências que os sustentassem não eram satisfatórias. Relatos sobre partículas retrovirais infecciosas em tumores humanos não puderam ser verificados. Até mesmo partículas virais contendo transcriptase reversa foram difíceis de serem encontradas em amostras de tumores humanos.

Ficou claro que a maioria dos genomas de retrovírus endógenos presentes no genoma humano é herança de infecções antigas da linhagem germinal que ocorreram 5 milhões de anos atrás e antes nos ancestrais primatas. Desde aquele tempo, esses pró-vírus mutaram progressivamente para seqüências que não são mais capazes de especificar partículas de retrovírus infeccioso e, portanto, se uniram à série de seqüências de DNA-lixo que formam o grande volume do nosso genoma. Mesmo que 8% do genoma humano derivem de genomas retrovirais endógenos, apenas alguns dos cerca de 40.000 segmentos derivados de retrovírus foram, alguma vez, apontados como geneticamente intactos e capazes, em princípio, de especificar partículas retrovirais. Uma subfamília destes vírus, chamada de HERV-K, entrou na linhagem germinal humana de forma relativa recentemente, e vários dos seus pró-vírus estão aparentemente intactos, mas até agora, não se observou que, até mesmo estes, produzissem viroses infecciosas ou que se mobilizassem em células cancerígenas. (Ainda não está claro por que a nossa linhagem germinal não continuou a adquirir novos pró-vírus endógenos funcionais durante épocas evolucionárias recentes, enquanto as linhagens germinais de outras espécies de mamíferos, como a do camundongo, abrigam viroses endógenas recentemente adquiridas que permanecem geneticamente intactas e, portanto, retêm função biológica.) Desse modo, os pesquisadores do câncer começaram a procurar em outros lugares pelos elementos genéticos que poderiam estar desencadeando a formação do câncer humano.

4.2 A transfecção do DNA fornece uma estratégia para detectar oncogenes não-virais

Para aqueles pesquisadores com o objetivo de compreender a carcinogênese não-viral, o legado da teoria do retrovírus endógeno deixou uma teoria viável sobre a mesa. De acordo com ela, os carcinógenos funcionam como mutagênicos (Seção 2.9). Tanto físicos (p. ex., raios X) como químicos (p. ex., piche de tabaco), esses agentes induzem câncer pela sua habilidade em mutar genes críticos de controle de crescimento nos genomas de células suscetíveis. Esses genes de controle de crescimento podem ser, por exemplo, genes celulares normais, como os proto-oncogenes descobertos pelos retrovirologistas. Uma vez que tais genes forem mutados, os alelos mutantes resultantes podem funcionar como oncogenes ativos, orientando o crescimento canceroso das células que os carregam.

Declarado de maneira distinta, esse modelo – na verdade uma especulação – previu que células transformadas quimicamente carregavam genes mutados, e que estes eram responsáveis por programar o crescimento aberrante de tais células. Era impossível prever o número de genes mutados presentes nos genomas dessas células. Mais importante, provas experimentais da existência desses genes causadores de câncer representaram um desafio assustador. Se eles realmente estivessem presentes nos genomas de células quimicamente transformadas,

Barra lateral 4.1 Os retrovírus endógenos podem explicar o desenvolvimento de tumores na ausência de dispersão de vírus infecciosos

A exposição de um camundongo ou galinha a um retrovírus frequentemente resulta na infecção de uma grande variedade de tipos celulares no organismo, incluindo na ocasião, as células nas gônadas – ovários ou testículos. As infecções de células nesses órgãos podem resultar na integração de um pró-vírus retroviral (veja a Seção 3.7) nos cromossomos de células que servem como precursoras tanto para o espermatozóide como para o óvulo. Tais pró-vírus tornaram-se estabelecidos em uma configuração genética que é equivalente àquela dos genes celulares carregados pelo espermatozóide ou pelo óvulo. Dessa forma, quando esses gametas participam da fertilização, o pró-vírus pode ser transmitido para um óvulo fertilizado e, assim, para todas as células resultantes de um embrião ou adulto (Figura 4.1). Esse pró-vírus poderá agora se tornar estabelecido no genoma de todos os animais que descenderem a partir do animal inicialmente infectado. Um pró-vírus deste tipo seria chamado de *vírus endógeno*, para ser distinguido de vírus que são transmissíveis de um indivíduo para outro por infecção.

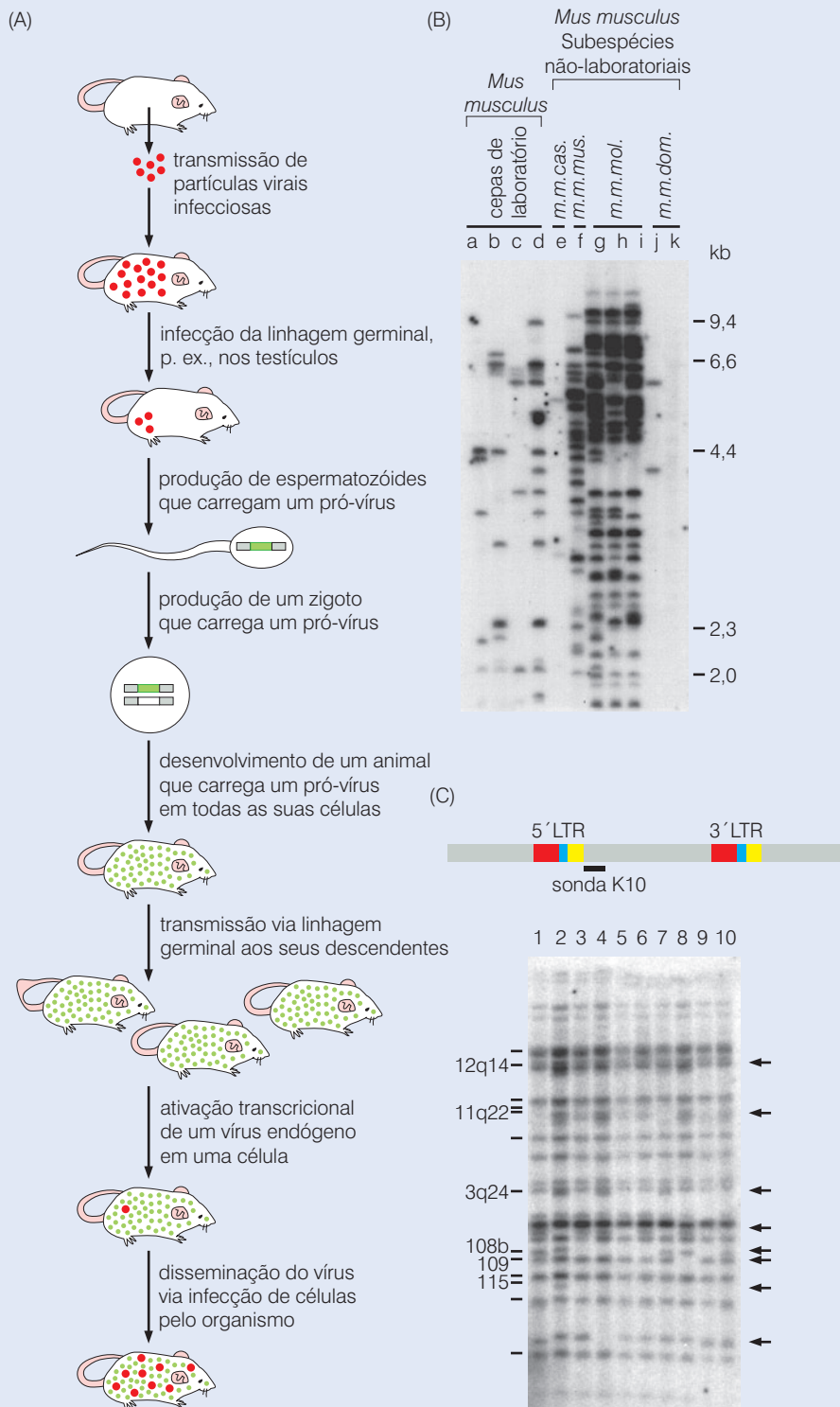
Pró-vírus endógenos que são prontamente transcritos em tecidos animais provavelmente produzem uma viremia e podem induzir câncer naquele animal, cedo na vida. Esses pró-vírus endógenos indutores de doença são então desvantajosos e serão rapidamente eliminados de um

conjunto de genes de uma espécie. Isso explica porque os pró-vírus endógenos encontrados nas linhagens germinais da maioria das espécies são, com rara exceção, transcripcionalmente silenciosos.

Exames cuidadosos dos genomas de uma variedade de espécies de mamíferos e de aves demonstraram a presença de inúmeros genomas de retrovírus endógenos, a maioria dos quais é claramente herança de infecções da linhagem germinal que ocorreram no passado evolucionário distante. Tendo residido por milhões de anos na linhagem germinal de uma espécie, a maioria já sofreu tantas mutações que eles já não são mais capazes de especificar partículas virais infecciosas. Entretanto, um pequeno subgrupo de genomas virais endógenos, notavelmente aqueles que foram recentemente inseridos na linhagem germinal de uma espécie, permanece geneticamente intacto. Dado um estímulo adequado, esses pró-vírus antes latentes podem de repente ser transcritos em uma ou outra célula, disseminar esta célula pelo organismo e finalmente iniciar algum tipo de malignidade, em geral de células hematopoiéticas (veja a Seção 3.11). Por exemplo, o alto índice de leucemia na linhagem AKR de camundongo é atribuído a ativação espontânea frequente de um pró-vírus endógeno de leucemia murina em um camundongo AKR, a disseminação infecciosa subsequente do vírus pelo camundongo, a viremia e, finalmente, por mutagênese de inserção, a ativação de um proto-oncogene e a erupção de uma leucemia.

Figura 4.1 Origem dos retrovírus endógenos (A) Estes genomas virais surgiram quando retrovírus (*pontos vermelhos*) tiveram sucesso em estabelecer uma infecção sistêmica em um organismo (p. ex., um camundongo, *alto*) e infectar, dentre outras células, uma célula precursora de gametas – espermatozóide ou óvulo. Uma vez que um retrovírus resultante (*retângulo verde*) se integra no genoma de um gameta (neste caso, um espermatozóide), ele pode ser introduzido no genoma de um óvulo fertilizado e depois ser distribuído para todas as células do organismo que estão surgindo a partir do zigoto (*pontos verdes*). Este organismo, por sua vez, pode transmitir o pró-vírus a seus descendentes via a rota normal da reprodução sexual. A ativação da expressão do pró-vírus endógeno em um animal (*abaixo*) pode levar a disseminação infecciosa pelo organismo, viremia e, finalmente, leucemia. (B) A presença de genomas de retrovírus endógeno (ERV) pode ser detectada sondando-se os DNAs genômicos de um organismo com o DNA de um retrovírus infeccioso. Estão mostrados os genomas ERV presentes nos DNAs de uma variedade de linhagens de camundongos e subespécies, como visualizado pelo procedimento de *Southern blotting* (veja a Figura 4.4). Neste caso, apenas a subclasse dos genomas ERV relacionados a retrovírus murino *xenotrópico* está sendo sondada. Cada banda em uma canaleta de gel representa um fragmento de restrição em um genoma celular que carrega parte ou tudo de um genoma ERV. A variabilidade dos sítios de integração de ERV de uma linhagem de laboratório para outra indica que inúmeros ERVs têm sido integrados na linhagem germinal do camundongo desde a especiação do *Mus musculus*, a espécie da qual todas estas linhagens derivaram. (C) Ao contrário dos genomas ERV de camundongo, aqueles detectados (usando como sonda um fragmento do clone de um ERV humano [*acima*]) em uma coletânea de DNAs humanos mostraram sítios de integração particularmente similares através das espécies, indicando a sua integração na linhagem germinal muito antes do surgimento da espécie humana; as diferenças polimórficas (*setas pretas*) são em grande parte os resultados da recombinação entre as seqüências LTR terminais nas extremidades de pró-vírus ERV individuais e a deleção resultante das extensões interferentes de DNA pró-viral. (B, a partir de K. Tomonaga and J.M. Coffin, *Virol.* 73:4327-4340, 1999; C, a partir de J.F. Hughes and J.M. Coffin, *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 101:1668-1672, 2004.)

incluindo, possivelmente, células tumorais humanas, como eles puderam ser encontrados? Se esses genes eram versões mutantes de genes celulares normais, então eles foram embutidos nos genomas de células cancerosas juntamente com dezenas de milhares, talvez até centenas de milhares, de outros genes, cada um presente em pelo menos uma cópia por genoma haplóide. Esses genes do câncer, caso existam, são como pequenas agulhas enterradas em enormes montes de feno.



Essa dificuldade fez com que fosse desenvolvida uma nova estratégia experimental para procurar por oncogenes nos genomas de vários tipos de células quimicamente transformadas. Em linhas gerais, essa estratégia envolveu a introdução de DNA (e, assim, de genes) de células cancerosas em células receptoras normais, para então determinar se as células receptoras se tornavam transformadas em resposta ao DNA de células tumorais introduzido. A estratégia dependeu de vários avanços experimentais, incluindo (1) o desenvolvimento de um procedimento efetivo de transferência de

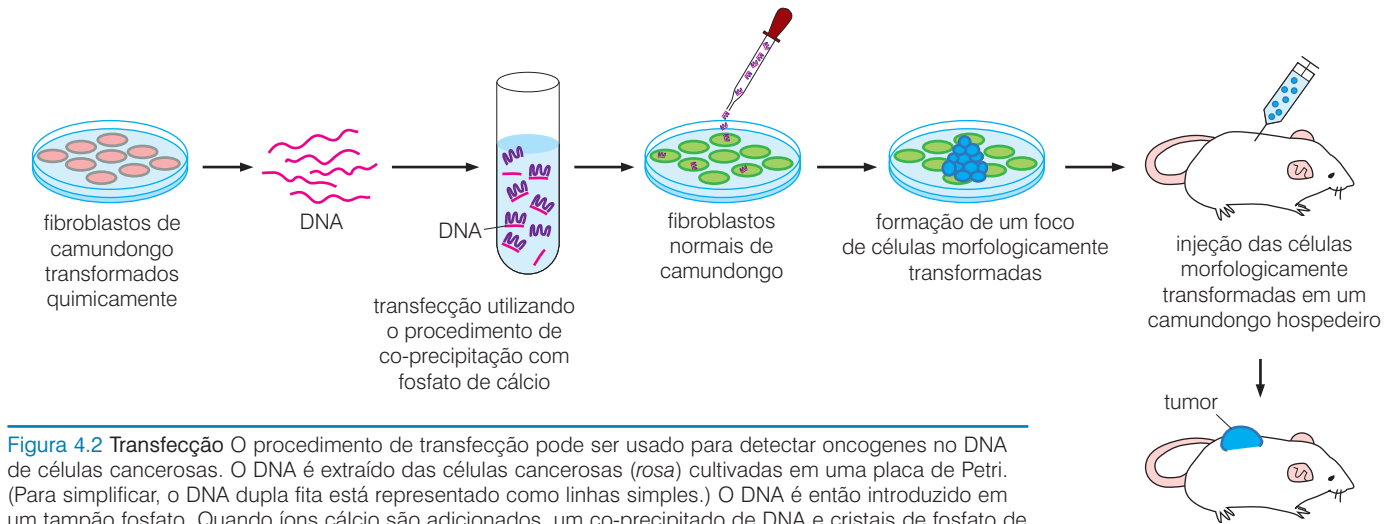


Figura 4.2 Transfecção O procedimento de transfecção pode ser usado para detectar oncogenes no DNA de células cancerosas. O DNA é extraído das células cancerosas (rosa) cultivadas em uma placa de Petri. (Para simplificar, o DNA dupla fita está representado como linhas simples.) O DNA é então introduzido em um tampão fosfato. Quando íons cálcio são adicionados, um co-precipitado de DNA e cristais de fosfato de cálcio é formado (rosa e roxo). Esses cristais são adicionados a uma camada simples de células normais em cultura (verde). De alguma forma, os cristais de fosfato de cálcio facilitam a entrada dos fragmentos de DNA nas células. Se um gene transformante (oncogene) está presente no DNA doador, ele poderá ser incorporado no genoma de uma das células receptoras e transformá-la. Esta célula transformada agora proliferará, e seus descendentes formarão uma massa (foco, azul) de células que é visível a olho nu. A injeção destas células em um camundongo hospedeiro e a resultante formação de um tumor pode ser usada para confirmar o estado transformado destas células.

genes, (2) o encontro de células cancerígenas apropriadas para extrair DNA e (3) a escolha de células receptoras apropriadas nas quais este DNA poderia ser introduzido (Figura 4.2).

Em 1972, um procedimento novo e altamente eficiente de transferência de genes foi desenvolvido, e logo ficou sendo chamado de técnica de **transfecção** (Barra lateral 4.2). O sucesso desta estratégia experimental também dependeu de achar células receptoras apropriadas que fossem receptivas para tomar as moléculas de DNA transfectadas pelo procedimento. Células da linhagem celular NIH 3T3, derivadas originalmente de fibroblastos de embrião de camundongo, revelaram-se ser sobretudo especialistas em tomar e integrar DNA estranho aos seus próprios genomas.

Dessa forma, os pesquisadores usaram a técnica de transfecção por fosfato de cálcio para introduzir DNA, extraído a partir de células tumorais, em células NIH 3T3 receptoras. Se o DNA de células tumorais introduzido carregasse um ou mais genes indutores de câncer, então ele induziria bem a transformação de algumas células NIH 3T3 receptoras. Essa transformação poderia ser pontuada pelo surgimento de focos de transformantes nas culturas de células NIH 3T3 algumas semanas depois da sua exposição ao DNA de células tumorais – essencialmente o ensaio que Howard Temin usou para pontuar a presença de partículas virais infecciosas transformantes do sarcoma de Rous, em monocamadas de fibroblastos de embrião de galinha (Seção 3.2).

O assunto final a ser resolvido, antes que esse plano experimental pudesse ter continuidade, era a identidade das células cancerosas doadoras das quais o DNA seria preparado. Nesse ponto, os pesquisadores estavam trabalhando às cegas. Não estava claro se todos os tipos de células cancerosas possuíam genes transformantes, como o oncogene *src* carregado por RSV. Também não se sabia se um gene celular transformante – um oncogene celular – que foi responsável por transformar uma célula epitelial normal em uma célula de carcinoma também seria capaz de funcionar no ambiente intracelular não-familiar das células do tecido conjuntivo (fibroblastos), como aquele das células NIH 3T3. Existiam agora outros possíveis problemas. Por exemplo, um oncogene que era responsável pela transformação de células normais humanas em células cancerosas poderia falhar em transformar células normais de camundongo por causa de algumas incompatibilidades entre espécies.

Barra lateral 4.2 A transfecção representa uma técnica muito útil de transferência de genes

O desenvolvimento, em 1972, de um procedimento de transfecção foi originalmente motivado pela necessidade de introduzir moléculas de DNA e RNA viral diretamente em células de mamíferos. Assim sendo, os pesquisadores poderiam dar a volta pela rota normal pela qual os genomas virais entram nas células – sendo carregados para dentro pelos vírions. Observou-se que a transfecção de adenovírus, SV40 e, até mesmo, de DNAs de retrovírus para dentro de células receptoras apropriadas resultava em ciclos de replicação viral que eram indistinguíveis daqueles iniciados por partículas virais infecciosas. Esses sucessos demonstraram a capacidade do procedimento de transfecção de introduzir moléculas de DNA relativamente longas, muitas vezes maiores do que 20 quilobases, para dentro de células receptoras. Mais tarde, esses procedimentos foram adaptados para transferir genes celulares de uma célula para outra.

Com o objetivo de realizar uma transfecção (veja a Figura 4.2), o DNA purificado de interesse é solubilizado em tampão fosfato. A adição de cálcio à solução causa a precipitação dos cristais de fosfato de cálcio e a co-precipitação do DNA que possa estar presente na solução. Quando esses cristais de fosfato de cálcio são colocados sobre monocamadas de células receptoras cultivadas em cultura, eles facilitam a introdução das moléculas de DNA para dentro dessas células, por um mecanismo que ainda não está claro. Uma vez dentro da célula receptora, uma pequena porção do DNA transfectado entra no núcleo e, de alguma forma, se integra ao DNA cromossomal desta célula, adquirindo assim a capacidade de ser transmitido para a prole dela juntamente com todos os seus genes nativos. Outras técnicas de transferência de genes têm sido desenvolvidas desde que esta foi inventada, mas os procedimentos com fosfato de cálcio continuam muito usados.

Com tais interesses em mente, pesquisadores escolheram células tumorais doadoras derivadas de fibroblastos de camundongo. Estas células cancerosas em particular originaram, com os fibroblastos de camundongo da linhagem celular de camundongo C3H10T1/2, que foi tratada repetidamente com o potente carcinógeno e mutagênico 3-metilcolantreno (3-MC), um componente conhecido como piche de carvão. É importante ressaltar que essas células não carregavam nenhum traço de infecção por vírus tumorais nem genomas retrovirais endógenos ativados. Assim, qualquer oncogene transformante detectado no seu genoma seria, com grande probabilidade, de origem celular; isto é, versões mutantes de genes celulares normais.

Em 1978-1979, DNAs extraídos de várias linhagens celulares de camundongos, transformadas com 3-MC, foram transfectados em culturas de células receptoras NIH 3T3, gerando grandes números de focos após algumas semanas. Observou-se mais tarde que as células colhidas dos focos resultantes eram tanto independentes de ancoramento como tumorigênicas. Esse experimento simples provou que o DNA tumoral doador carregava um ou vários elementos genéticos que eram capazes de converter uma célula receptora NIH 3T3 não-tumorigênica em uma célula que era fortemente tumorigênica.

DNA extraído de células C3H10T1/2 normais não-transformadas era incapaz de induzir focos nas monocamadas de células NIH 3T3. É muito provável que a prévia exposição de células C3H10T1/2 normais ao carcinógeno 3-MC alteraram os genomas dessas células de alguma forma, resultando na criação de novas seqüências genéticas que possuem forças transformantes. Em outras palavras, parece que o carcinógeno 3-MC converteu um gene (ou genes) C3H10T1/2, antes normal, em um alelo mutante que poderia funcionar como um oncogene transformante quando introduzido em células NIH 3T3.

Primeiro, pareceu bastante difícil determinar se as células tumorais doadoras carregavam um único oncogene no seu genoma ou vários oncogenes distintos transformantes que atuavam em conjunto para transformar as células receptoras. Uma análise cuidadosa do procedimento de transfecção logo resolveu a questão. Pesquisadores descobriram que quando DNA celular era aplicado a uma célula receptora, apenas cerca de 0,1% do genoma celular, possuidor de DNA doador, se estabilizava no genoma de cada célula receptora transfectada. A probabilidade de dois genes doadores independentes, geneticamente não-relacionados, serem introduzidos em uma única célula receptora era de $10^{-3} \times 10^{-3} = 10^{-6}$, isto é, um evento muito improvável. A partir deste cálculo, pode ser inferido que apenas um único gene era responsável pela transformação das células NIH 3T3

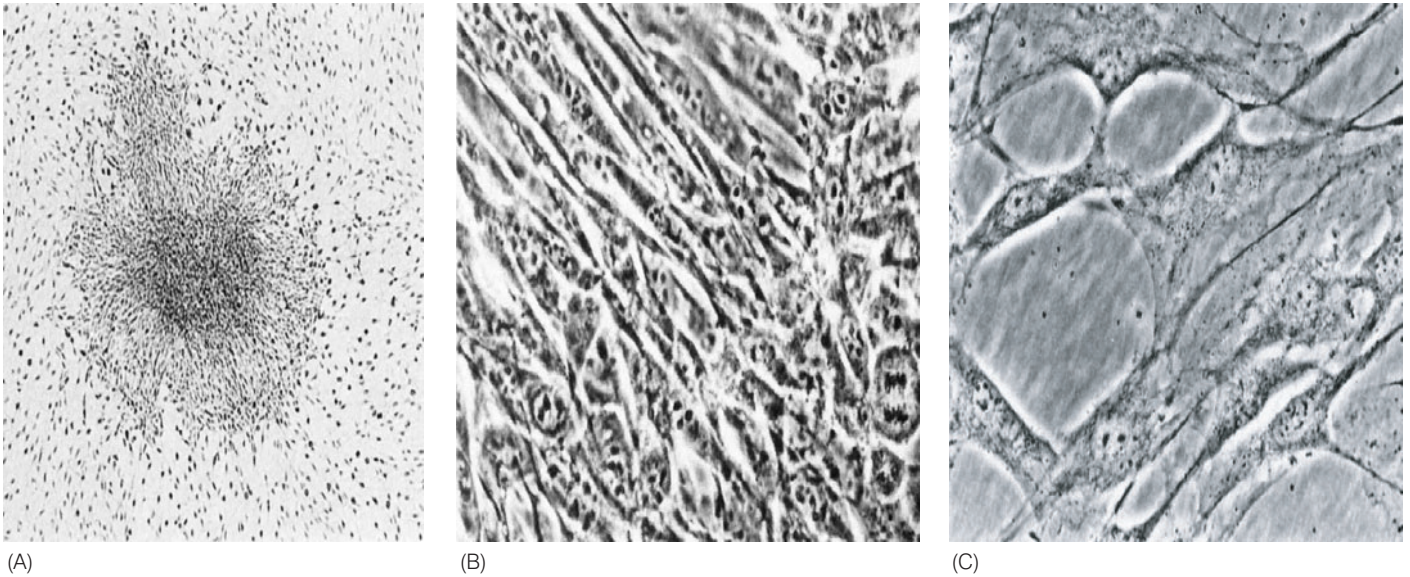


Figura 4.3 Transformação de células de camundongo por DNA de tumores humanos A introdução via transfecção de vários DNAs de tumores humanos para dentro de células NIH 3T3 gerou focos de transformantes. (A) Um foco gerado pela transfecção de DNA a partir da linhagem celular do carcinoma de bexiga T24 humano. (B) Imagem em alta magnitude das células transformadas dentro deste foco. Como vários tipos de fibroblastos transformados, estes são em forma de fuso, refráteis e empilhados densamente uns sobre os outros. (C) Imagem em alta magnitude das células NIH 3T3 ao redor da monocamada de células não-transformadas. Como fibroblastos normais, estes têm um citoplasma largo e estendido e não estão empilhados uns sobre os outros. (A partir de M. Perucho et al., *Cell* 27:467-476, 1981.)

depois da transfecção com o DNA das células tumorais doadoras. Isso, por sua vez, levou à conclusão de que anos antes da exposição de células normais de camundongo C3H10T1/2 ao carcinógeno 3-MC ocorreu a formação de um único alelo oncogenético mutante; este era capaz de, por si só, transformar tanto células C3H10T1/2 como, mais tarde, as células NIH 3T3 receptoras nas quais foi introduzido por transferência de genes.

Esses experimentos de transfecção foram muito importantes, uma vez que forneceram fortes indicações de que oncogenes podem surgir nos genomas de células por meio de mecanismos que aparentemente não têm conexão com infecção viral. Possivelmente células tumorais humanas, que também pareceram surgir via mecanismos não-virais, também carregavam oncogenes transfectáveis. Seriam os oncogenes humanos, se presentes nos genomas destas células, também capazes de alterar o comportamento de células de camundongo?

Ambas as questões em seguida serão respondidas como afirmativas. DNAs extraídos a partir de linhagens celulares derivadas de carcinomas humanos de bexiga, pulmões e cólon, assim como DNA de leucemia promielocítica humana, foram capazes de transformar células receptoras NIH 3T3 (Figura 4.3). Isso significa que oncogenes nessas linhagens celulares, qualquer que seja sua natureza, foram capazes de atuar independentemente dos limites entre espécies e tecidos para induzir a transformação celular.

4.3 Os oncogenes descobertos nas linhagens de células tumorais humanas estão relacionados com aqueles carregados pelos retrovírus transformantes

Os oncogenes detectados por transfecção nos genomas de várias células tumorais humanas eram evidentemente derivados de genes celulares normais preexistentes que não têm a função oncogênica. Isso pareceu corresponder ao processo que levou ao aparecimento de retrovírus transformantes (Seção 3.9). Lembre que durante a formação destes vírus, genes celulares normais preexistentes – proto-oncogenes – se ativaram em oncogenes potentes, embora por um mecanismo genético distinto.

Esses paralelos aparentes levaram a uma questão óbvia: poderia o mesmo grupo de proto-oncogenes celulares tornar-se ativado em oncogenes pela obtenção de retrovírus em um contexto e por mutagênicos não-virais em outro? Ou os oncogenes associados a retrovírus e aqueles ativados por mecanismos não-virais surgiram a partir de dois grupos muito distintos de proto-oncogenes celulares?

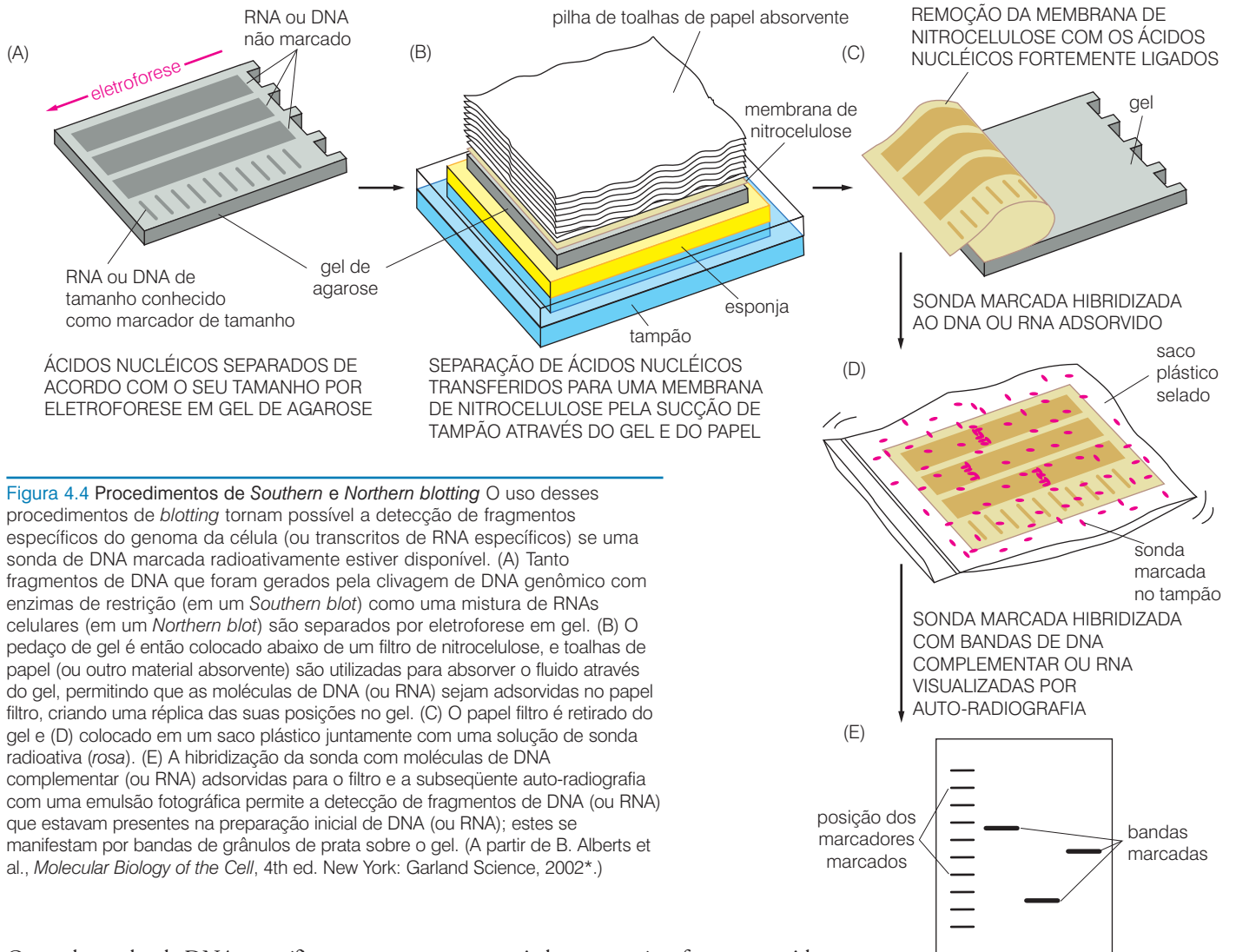


Figura 4.4 Procedimentos de *Southern* e *Northern blotting* O uso desses procedimentos de *blotting* tornam possível a detecção de fragmentos específicos do genoma da célula (ou transcritos de RNA específicos) se uma sonda de DNA marcada radioativamente estiver disponível. (A) Tanto fragmentos de DNA que foram gerados pela clivagem de DNA genômico com enzimas de restrição (em um *Southern blot*) como uma mistura de RNAs celulares (em um *Northern blot*) são separados por eletroforese em gel. (B) O pedaço de gel é então colocado abaixo de um filtro de nitrocelulose, e toalhas de papel (ou outro material absorvente) são utilizadas para absorver o fluido através do gel, permitindo que as moléculas de DNA (ou RNA) sejam adsorvidas no papel filtro, criando uma réplica das suas posições no gel. (C) O papel filtro é retirado do gel e (D) colocado em um saco plástico juntamente com uma solução de sonda radioativa (rosa). (E) A hibridização da sonda com moléculas de DNA complementar (ou RNA) adsorvidas para o filtro e a subsequente auto-radiografia com uma emulsão fotográfica permite a detecção de fragmentos de DNA (ou RNA) que estavam presentes na preparação inicial de DNA (ou RNA); estes se manifestam por bandas de grânulos de prata sobre o gel. (A partir de B. Alberts et al., *Molecular Biology of the Cell*, 4th ed. New York: Garland Science, 2002*.)

O uso de sondas de DNA específicas para oncogenes associados a retrovírus forneceu rapidamente as respostas. Pelo uso do procedimento de *Southern blot* (Figura 4.4), uma sonda de DNA derivada do oncogene *H-ras* no vírus do sarcoma Harvey de rato foi capaz de reconhecer e formar híbridos com o oncogene detectado pela transfecção no DNA de uma célula de carcinoma humano de bexiga (Figura 4.5). Um oncogene relacionado, chamado de *K-ras* por causa da sua presença no genoma do vírus do sarcoma de Kirsten, foi capaz de anelar com o

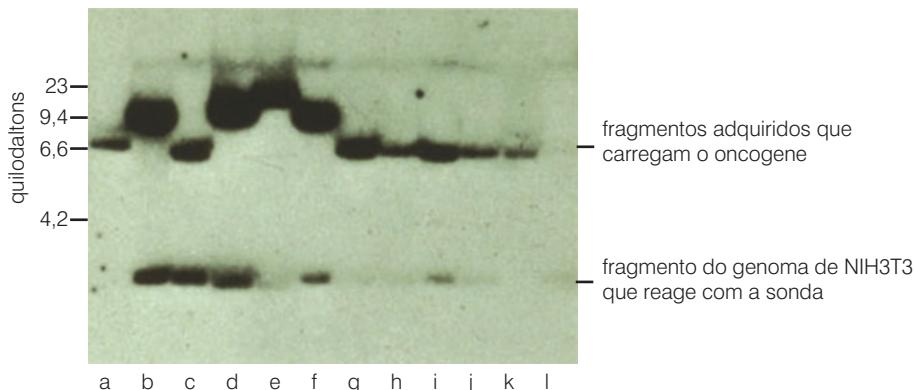


Figura 4.5 Homologia entre oncogenes transfectados e oncogenes retrovirais O procedimento de *Southern blot* (ver Figura 4.4) foi utilizado para determinar se existia alguma relação entre os oncogenes associados a retrovírus e aqueles descobertos pela transfecção de DNA de células tumorais. DNAs de oncogenes retrovirais clonados foram usados para fazer sondas marcadas radioativamente, enquanto DNAs genômicos de células transfectadas, clivados por enzimas de restrição, foram analisados pelo procedimento de *Southern blot*. É mostrado o anelamento entre a sonda do oncogene *H-ras* marcada radioativamente (clonada a partir do genoma do vírus do sarcoma murino de Harvey) e os DNAs genômicos de uma série de 11 linhagens de células NIH 3T3 (canaletas de a até k) que foram transformadas por transfecção do DNA extraído a partir de uma linhagem celular de carcinoma humano de bexiga; o DNA de células NIH 3T3 não-transfectadas foi analisado na canaleta l. (A partir de L.F. Parada et al., *Nature* 297:474-478, 1982.)

* Publicado, em português, pela Artmed Editora, com o título *Biologia Molecular da Célula*, em 2004.

oncogene detectado pela transfecção de DNA a partir de uma linhagem celular de carcinoma humano de cólon.

A lista de conexões entre os oncogenes associados a retrovírus e os oncogenes presentes em tumores humanos não-induzidos por vírus logo cresceu com grande velocidade (Tabela 4.1). Nesses casos, as conexões freqüentemente foram forjadas após a descoberta de que oncogenes associados a retrovírus estavam presentes em um número aumentado de cópias nos genomas celulares de tumores humanos. Observou-se que o oncogene *myc*, originalmente conhecido pela sua presença no vírus da mielocitomatose aviária (AMV; veja a Seção 3.10), estava presente em múltiplas cópias no DNA da linhagem celular HL-60 da leucemia promielocítica humana. Essas cópias extras do gene *myc* (cerca de 1 a 20 por genoma diplóide) foram o resultado do processo de **amplificação gênica**, e sugeriu-se que elas causaram níveis proporcionalmente elevados do seu produto protéico; isso de alguma forma favoreceu a proliferação das células cancerígenas. Observou-se que o gene *erb*, primeiramente descoberto pela sua presença no genoma do vírus da eritroblastose aviária (AEV; consultar Tabela 3.3), estava presente em um número de cópias aumentado nos DNAs de células de tumor de estômago, mama e cérebro humanos. (Eritroblastose é uma malignidade de precursores de células vermelhas do sangue.) Atualmente acredita-se que a expressão elevada do homólogo do gene *erbB* está presente na maioria dos carcinomas humanos.

Em 1987, a amplificação do gene relacionado a *erbB*, conhecido também como *erbB2*, *neu* ou *HER2*, foi reportada em vários cânceres de mama (Figura 4.6A). Observou-se que aumentos no número de cópias do gene em mais de cinco cópias por célula cancerosa estavam relacionados com uma baixa sobrevivência de pacientes que carregam esses tumores (Figura 4.6B). (Esta figura mostra um gráfico de Kaplan-Meier, no qual a porcentagem de pacientes que sobrevivem está representada nas ordenadas em função do tempo após o diagnóstico inicial ou tratamento, que está representado na abscissa. Usaremos essa convenção gráfica repetidamente ao longo deste livro.) Significativamente, a amplificação observada do gene *erbB2/HER2* foi correlacionada com uma expressão elevada da sua proteína codificante (Fi-

TABELA 4.1 Exemplos de oncogenes associados a retrovírus que foram descobertos em formas alteradas de cânceres humanos

Nome do vírus	Espécie	Oncogene	Tipo de oncoproteína	Oncogene homólogo encontrado em tumores humanos
sarcoma de Rous	galinha	<i>src</i>	receptor TK	carcinoma de cólon ^a
leucemia Abelson	camundongo	<i>abl</i>	não-receptor TK	CML
eritroblastose aviária	camundongo	<i>erbB</i>	receptor TK	estômago, pulmões, mama ^b
sarcoma felino de McDonough	gato	<i>fms</i>	receptor TK	AML ^c
H-Z felino	gato	<i>kit</i>	receptor TK ^d	estroma gastrointestinal
sarcoma murino 3611	camundongo	<i>raf</i>	cinase Ser/Thr ^e	carcinoma de bexiga
sarcoma símio	macaco	<i>sis</i>	fator de crescimento (PDGF)	vários tipos ^f
sarcoma de Harvey	camundongo/rato	<i>H-ras</i> ^g	proteína G pequena	carcinoma de bexiga
sarcoma de Kirsten	camundongo/rato	<i>K-ras</i> ^g	proteína G pequena	vários tipos
eritroblastose aviária	galinha	<i>erbA</i>	receptor nuclear ^h	fígado, rins, pituitária
mieloblastose aviária E26	galinha	<i>ets</i>	fator de transcrição	leucemia ⁱ
mielocitoma aviário	galinha	<i>myc</i> ^j	fator de transcrição	vários tipos
reticuloendoteliose	peru	<i>rel</i> ^k	fator de transcrição	linfoma

AML = leucemia mielógena aguda; CML = leucemia mielógena crônica.

^aFormas mutantes encontradas em um pequeno número destes tumores.

^bReceptor para EGF; a proteína *erbB2/HER2/Neu* relacionada é superexpressa em 30% dos cânceres de mama.

^c*Fms*, o receptor para o fator estimulador de colônias (CSF-1), é encontrado na forma mutante em um pequeno número de AMLs; a proteína *Flt3* (tirosina cinase-3 semelhante a *Fms*) relacionada é freqüentemente encontrada na forma mutante nessas leucemias.

^dReceptor para o fator de células-tronco.

^eA proteína B-Raf intimamente relacionada é mutante na maioria dos melanomas.

^fA proteína é superexpressa em vários tipos de tumores.

^gO gene relacionado *N-ras* é encontrado na forma mutante em uma variedade de tumores humanos.

^hReceptor para o hormônio da tireóide.

ⁱVinte e sete membros distintos da família *Ets* de fatores de transcrição são codificadas no genoma humano. *Ets-1* é superexpressa em vários tipos de tumores; outras estão envolvidas nas translocações em AML e nos sarcomas de Ewing.

^jO gene relacionado *N-myc* é superexpresso em neuroblastomas pediátricos e carcinomas de pequenas células dos pulmões.

^k*Rel* é um membro de uma família de proteínas que constituem o fator de transcrição NF- κ B, que é ativado constitutivamente em um amplo espectro de tumores humanos.

Adaptada, em parte, a partir de J. Butel, *Carcinogenesis* 21:405-426, 2000; e G.M. Cooper, *Oncogenes*, 2nd ed. Boston and London: Jones and Barlett, 1995.

gura 4.6C). Entre um amplo grupo de pacientes com câncer de mama, aqueles indivíduos cujos tumores expressaram níveis normais dessa proteína mostraram uma sobrevivência média de apenas três anos. A correlação inversa entre os níveis de expressão de *erbB2/neu* e a sobrevivência dos pacientes por longo período forneceu uma forte indicação que esse gene, na forma amplificada, estava casualmente envolvido no direcionamento do crescimento maligno das células do câncer de mama (veja a Barra Lateral 4.3).

Ironicamente, alelos mutantes do oncogene *src*, o primeiro oncogene celular a ser descoberto, provaram ser elusivo nos genomas celulares de tumores humanos. Em 1999 – quase um quarto de século depois de o gene *src* ter sido clonado –, formas mutantes do gene *src* foram encontradas nos genomas de células tumorais humanas, especificamente, nos genomas de 12% dos carcinomas humanos avançados de cólon.

O ensinamento dessas inúmeras conexões cruzadas foi simples e claro: vários dos oncogenes originalmente descobertos pela sua associação com retrovírus aviários ou de mamíferos pude-

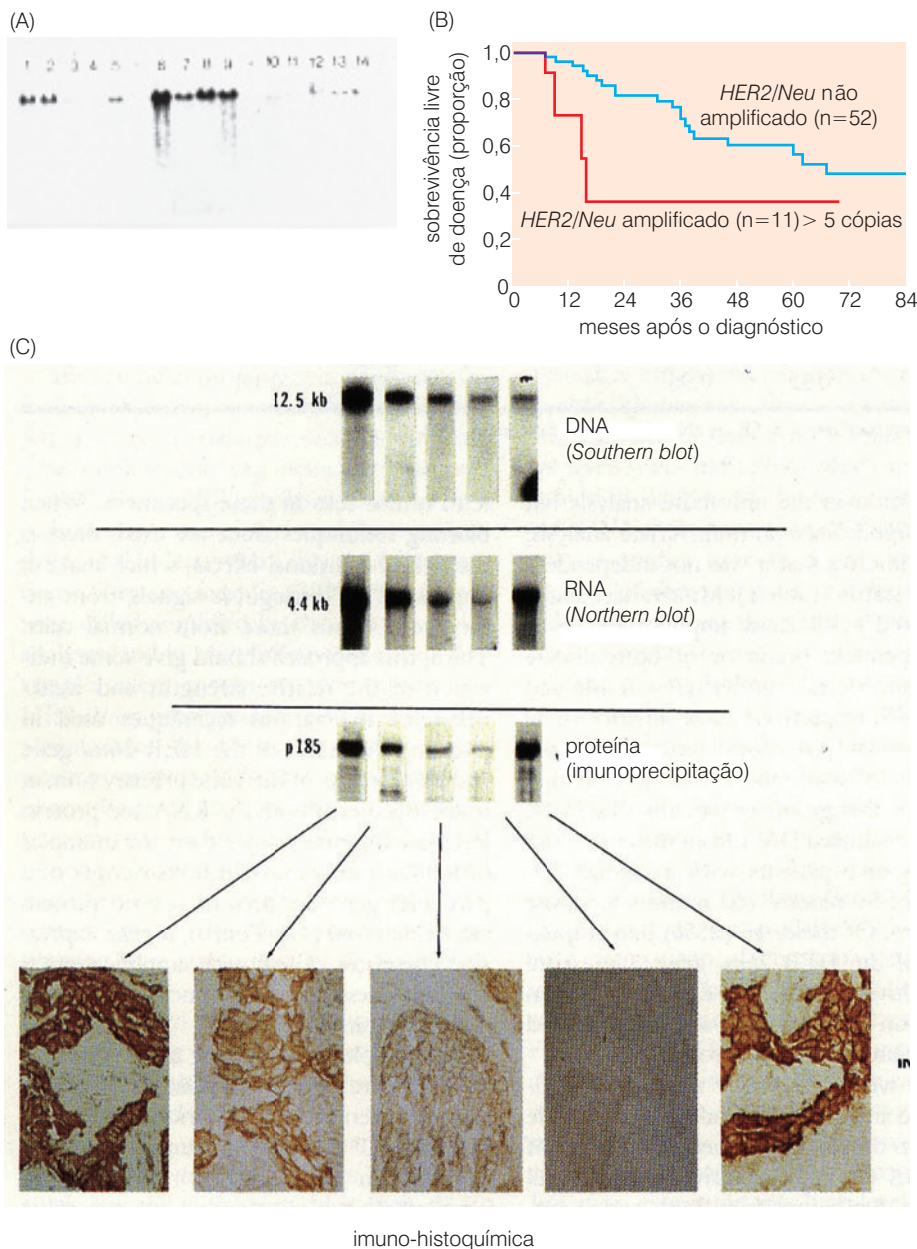
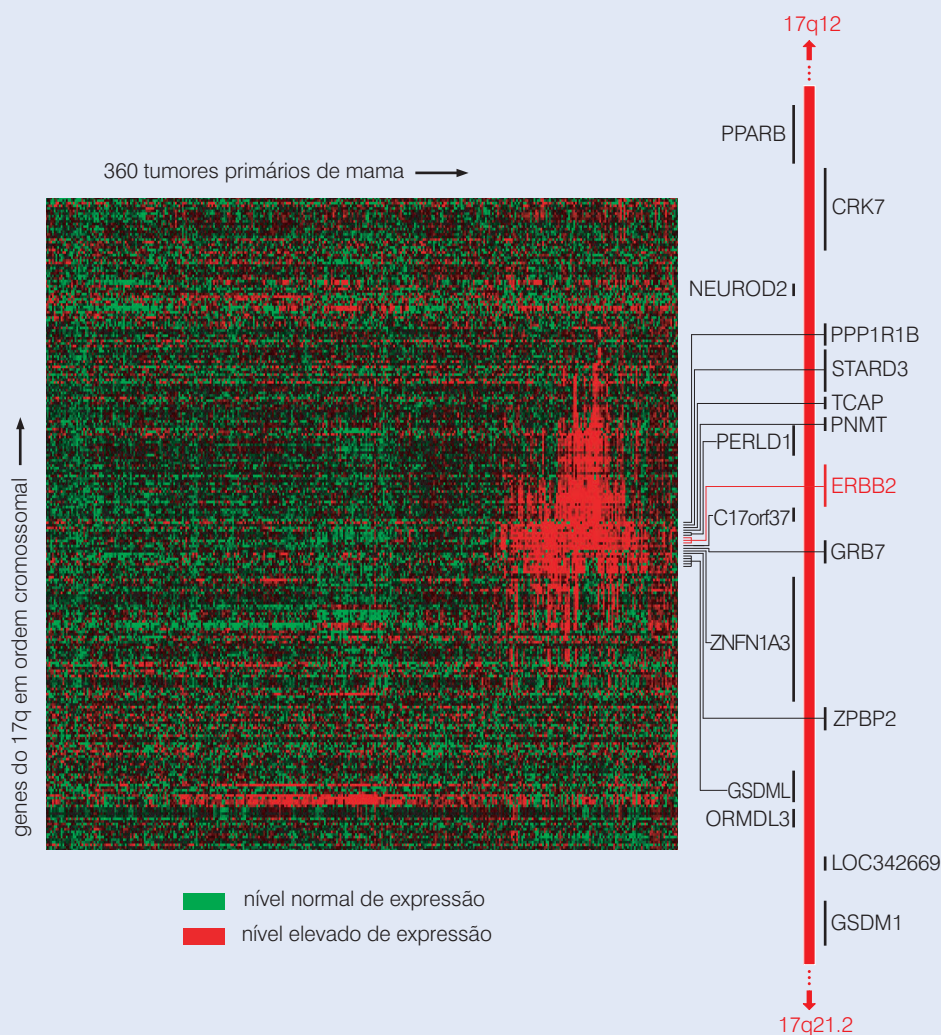


Figura 4.6 Amplificação do oncogene *erbB2/neu* nos cânceres de mama (A) O procedimento de *Southern blotting* foi utilizado para determinar se o DNA dos carcinomas humanos de mama carregavam cópias extras (i. e., amplificadas) do oncogene *erbB2/neu* (também chamado de *HER2*), um parente próximo do oncogene *erbB*. Como indicado pelas bandas escuras que representam os fragmentos gerados por enzimas de restrição, alguns carcinomas humanos de mama carregam cópias extras desse gene. (B) Esta amplificação gênica está correlacionada com um pior prognóstico para o paciente com câncer de mama, como indicado pelo gráfico de Kaplan-Meier. Aqueles pacientes cujos tumores carregavam mais do que cinco cópias do gene *erbB2/neu* estavam bem mais inclinados a sofrer uma reincidência nos primeiros 18 meses após o diagnóstico e tratamento do que aqueles pacientes cujos tumores não apresentavam essa amplificação. (Todos os pacientes incluídos nesse estudo apresentavam células cancerosas de mama nos linfonodos que drenam a mama envolvida.) (C) Um trabalho subsequente indicou que, enquanto o oncogene *erbB2/neu* era amplificado em alguns tumores ("DNA"), outros superexpressavam o mRNA sem amplificação gênica ("RNA"), e, ainda outros, expressavam níveis aumentados da proteína sem indicações da amplificação gênica ou transcrição elevada ("proteína"). O aumento da proteína ErbB2/Neu também pode ser demonstrado pela coloração de cortes de tecido com um anticorpo que reage com a proteína e produz uma coloração densa (marrom) em alguns tumores, mas não em outros ("imuno-histoquímica"). (A e B, a partir de D.J. Slamon et al., *Science* 235:177-182, 1987; cortesia de D.J. Slamon.)

Barra Lateral 4.3 A amplificação gênica pode ser difícil de ser interpretada A descoberta de que o gene *erbB2/neu/HER2* é amplificado em cerca de 30% dos cânceres humanos de mama e de que essa amplificação está correlacionada com um mau prognóstico (veja a Figura 4.6) pareceu explicar como os cânceres de mama altamente malignos adquirem seu fenótipo agressivo. Sabe-se que a sinalização elevada pela proteína ErbB2 direciona as células para ciclos infinitos de crescimento e divisão e também as protege da morte celular programada – a apoptose. Entretanto, análises dos padrões de expressão (Figura 4.7) geram mais interpretações complexas. Na análise do arranjo de expressão mostrado aqui, os níveis de expressão de um grupo de 160 genes que flanqueiam esse gene (neste caso, marcado como ERBB2) em ambos os lados ao longo do cromossomo humano 17q, juntamente com a própria expressão desse gene, foram monitorados em uma série de 360 cânceres humanos de mama. A expressão elevada está indicada em vermelho, enquanto a expressão normal está indicada em verde. Como é aparente, em cerca de um quarto desses cânceres de mama (*quarto direito do ar-*

ranjo), a expressão do RNA de *erbB2/neu/HER2* estava elevada, como pode ser esperado da amplificação que ele sofreu em vários desses tumores. Ao mesmo tempo, em vários desses tumores, a expressão de genes intimamente relacionados localizados em ambos os lados desse gene também estava elevada. Isso reflete o fato de que a unidade de amplificação de DNA – o **amplicon** – quase sempre incluía uma extensão de DNA cromossomal que era muito mais longa do que o próprio gene *erbB2/neu/HER2*, levando à co-amplificação desses genes vizinhos. Entre esses genes estão vários que também podem influenciar positivamente a proliferação e sobrevivência celular, incluindo *GRB7* e *PPARB*, cujos produtos protéicos interagem com ErbB2 (veja o Capítulo 5) e com o circuito da apoptose (veja o Capítulo 9), respectivamente. Ainda, em tais casos, alguns genes co-amplificados podem estar colaborando para orquestrar o fenótipo maligno das células do câncer de mama humano e torna-se difícil atribuir fenótipos específicos de células cancerosas à elevada expressão de apenas um único gene, como o *erbB2/neu/HER2* aqui discutido.

Figura 4.7 Aumento da expressão dos genes 17q juntamente com a superexpressão de *HER2/Neu/erbB2* A amplificação de um gene, como *HER2/Neu/erbB2* (i. e., *HER2*), ocorre como consequência da amplificação de um segmento cromossomal inteiro – um amplicon –, que normalmente se estende além desse gene para ambos os lados por várias megabases. Como o amplicon abrange genes adicionais, estes também serão amplificados e podem afetar o fenótipo da célula tumoral (neste caso, aquele das células do câncer de mama). O mapa de alguns desses genes identificados, que flanqueiam *HER2/Neu/erbB2* em ambos os lados, é fornecido (*barra vertical vermelha, direita*). Neste caso, amostras de RNA de tumores de mama primários foram analisadas (*colunas, da esquerda para direita*), enquanto sondas para 160 genes distintos nesta região cromossomal foram ordenadas na ordem da sua localização ao longo do Cromossomo 17q humano (i. e., o braço longo do Cromossomo 17) (*fileiras, de cima para baixo*). Aqueles tumores com padrões similares de expressão gênica, incluindo a expressão elevada de *HER2*, foram agrupados por um computador e estão reunidos na *direita*. Como é evidente, os genes que flanqueiam *HER2* também foram superexpressos em vários destes tumores. (Cortesia de L.D. Miller.)



ram ser encontrados mutados em um estado ativado nos genomas de células humanas tumorais. Isso significou que um grupo comum de proto-oncogenes celulares poderia ser ativado ou por retrovírus (em animais) ou, alternativamente, por mecanismos de mutação não-virais que operam durante a formação dos cânceres humanos.

4.4 Pró-oncogenes podem ser ativados por mudanças genéticas que afetam ou a expressão da proteína ou a sua estrutura

Enquanto um número de proto-oncogenes era encontrado na forma oncogênica ativada, nos genomas de tumores humanos, as alterações genéticas precisas que levaram a várias dessas ativações ainda não estão claras. No caso dos oncogenes associados a retrovírus, um mecanismo tornou-se óbvio, uma vez que a organização dos genomas retrovirais transformantes era desconhecida. Na célula normal, a expressão de cada proto-oncogene pareceu ser regulada pelo seu próprio promotor transcricional – a sequência de DNA que controla o nível da sua transcrição. O promotor de cada proto-oncogene permite que o gene responda a uma variedade de sinais fisiológicos. Frequentemente as necessidades das células, comunicadas por sinais, fizeram com que um proto-oncogene fosse expressado em níveis muito baixos. Em outros casos, quando exigido pela célula, a expressão do gene poderia ser bastante induzida.

Uma situação completamente diferente se estabelece depois que um proto-oncogene foi adquirido por um retrovírus. Após a inserção no genoma do retrovírus, a expressão desse gene capturado foi controlada por um promotor transcricional do retrovírus (veja a Figura 3.19), que invariavelmente conduziu a expressão gênica de maneira contínua e a altos níveis. A transcrição desses genes associados a vírus, agora oncogenes, então não era mais responsiva aos sinais celulares que antes regulavam a sua expressão. Por exemplo, no caso de *c-myc*, a sua expressão ou **repressão** (i. e., interrupção) em geral é muito controlada pelas alterações de níveis de sinais extracelulares, como aqueles conduzidos pelos fatores de crescimento mitogênicos (a serem discutidos no Capítulo 5). Uma vez presente no genoma do vírus da mielocitomatose aviária (AMV), observa-se que a expressão desse gene (agora chamado de *v-myc*) está em níveis muito mais altos dos que normalmente são observados nas células e ocorre em níveis constantes (às vezes chamados de **constitutivos**).

Mas como um proto-oncogene humano *H-ras* normal se converteu no potente oncogene que foi detectado por transfecção do DNA do carcinoma humano de bexiga (uma célula normal humana) (veja a Seção 4.2)? A amplificação gênica não poderia ser invocada para explicar a sua ativação, já que esse oncogene pareceu estar presente no DNA do carcinoma de bexiga como gene de simples cópia. O “quebra-cabeça” cresceu quando esse oncogene *H-ras* de carcinoma de bexiga foi isolado por clonagem molecular (Barra Lateral 4.4). Ele foi localizado em um fragmento de DNA genômico de 6,6 quilobases de comprimento. De forma provocativa, um fragmento de DNA com tamanho idêntico foi encontrado em DNAs humanos normais. O último fragmento claramente representou o proto-oncogene *H-ras* humano – o gene normal que sofreu algum tipo de mutação que o converteu em um oncogene durante a formação do carcinoma de bexiga.

Enquanto as suas estruturas de DNA gerais eram muito similares, essas duas versões do gene *H-ras* se apresentaram de maneiras muito diferentes. O oncogene que foi clonado a partir de células de carcinoma humano de bexiga causou a transformação de células NIH 3T3, enquanto o proto-oncogene contraparte normal (i. e., o gene *H-ras* normal) não tinha essa habilidade. O mistério aprofundou mais quando um mapeamento mais detalhado das estruturas físicas desses dois segmentos de DNA – obtido pelo mapeamento dos sítios de clivagem de várias enzimas de restrição – revelou que as duas versões do gene tinham estruturas físicas gerais que eram indistinguíveis entre elas.

Até então, claramente, as duas versões do gene *H-ras* tinham algumas diferenças significativas nas suas sequências, pois funcionavam de maneira muito distintas. A diferença crítica na sequência foi inicialmente localizada pela recombinação de segmentos do pro-

Barra Lateral 4.4 Clonagem de oncogenes transfectados O oncogene da linhagem celular T24/EJ do carcinoma humano de bexiga foi clonado por dois grupos de pesquisa antes que a sua relação com o oncogene *H-ras* dos vírus do sarcoma de Harvey fosse conhecida. Esses grupos encararam o desafio de isolar um gene sem conhecer nada sobre a sua sequência ou estrutura. Um grupo de pesquisadores transfectou DNA de células de carcinoma humano de bexiga em células NIH 3T3 de camundongo (Figura 4.8). Eles usaram *Southern blotting* (veja a Figura 4.4) para detectar o DNA doador aproveitando sondas que eram específicas para as sequências repetições *Alu*, que estão espalhadas aleatoriamente pelo genoma humano em quase um milhão de locais, mas estão ausentes do genoma de camundongo. (Mais precisamente, sequências repetidas de camundongos distantemente relacionadas não são reconhecidas por sondas de DNA que são específicas para as repetições *Alu* humanas.) Dessa forma, sequências *Alu* estão presentes no genoma humano, em média, a cada 5 kb aproximadamente. Por consequência, era provável que o oncogene do carcinoma humano de bexiga carregasse consigo algumas sequências *Alu* humanas para as células de camundongo receptoras durante o procedimento de transfecção.

De fato, os pesquisadores encontraram um número relativamente pequeno de sequências *Alu* humanas (cerca de 0,1% de um total de genoma humano possuidor de sequências *Alu*; veja a Seção 4.2) nos genomas de células de camundongo transformadas, transfectadas. Eles então prepararam DNA genômico total a partir das células NIH 3T3 transformadas e as transfectaram mais uma vez para dentro de células NIH 3T3 frescas e isolaram as células transformadas que surgiram depois deste segundo ciclo de transfecção. Mais uma vez, apenas cerca de 0,1% do DNA doador foi transferido do doador para o receptor (veja a Figura 4.8). Nessas células transfectadas pela segunda vez, as únicas sequências *Alu* humanas que sobreviveram aos dois ciclos de transfecção foram aquelas que estão intimamente relacionadas ao oncogene responsável pela transformação observada (i. e., eles foram “carregados ao longo da jornada” juntamente com o oncogene humano cujo fenótipo estava sendo selecionado). Os pesquisadores então utilizaram uma sonda com uma sequência humana específica a *Alu* para identificar a presença de um fragmento de DNA contendo *Alu* em uma coleção (uma biblioteca genômica) de fragmentos de DNA preparada a partir de DNA genômico das células transfectadas pela segunda vez. Eles resgataram esse fragmento usando procedimentos padrões de clonagem de genes. O segmento de

DNA clonado contendo *Alu* foi encontrado carregando, em adição, o oncogene do carcinoma de bexiga procurado há tempo.

O outro grupo de pesquisa usou um procedimento que fez com que o gene do carcinoma de bexiga se tornasse intimamente ligado a um gene bacteriano durante o primeiro evento de transfecção. Eles então seguiram o destino deste segmento bacteriano por um outro ciclo de transfecção e, pela utilização de uma sonda específica para ele, foram capazes de isolar tanto o segmento bacteriano como a célula de carcinoma de bexiga ligada a partir das células transfectadas por clonagem molecular.

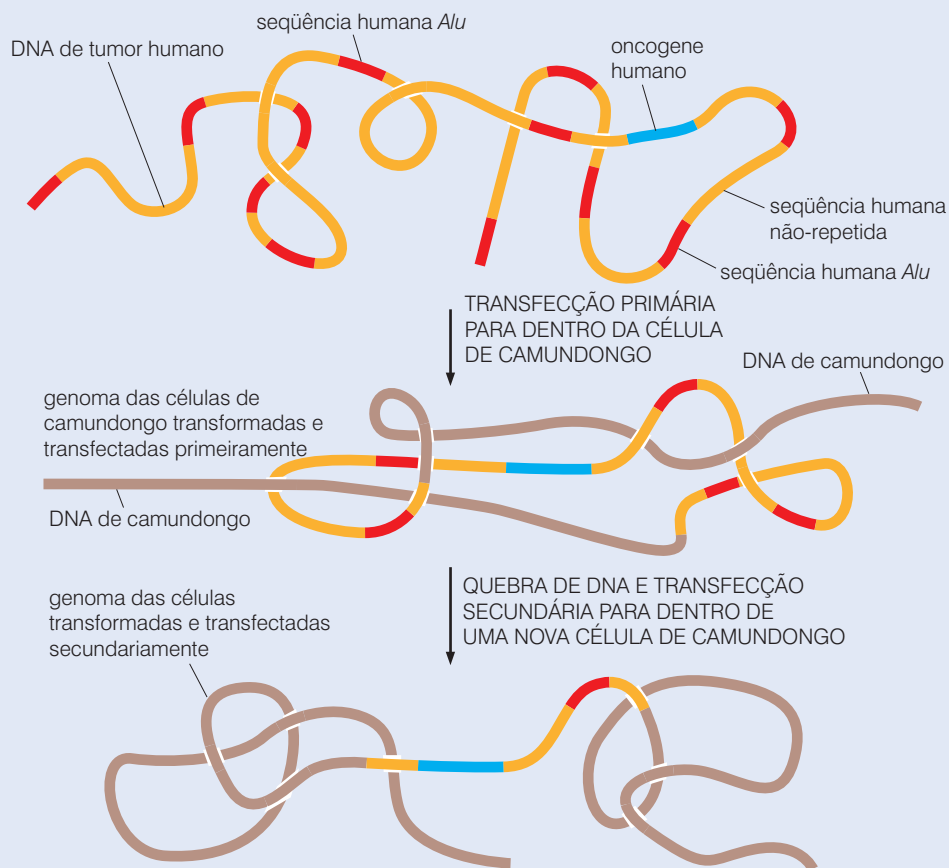


Figura 4.8 Clonagem de oncogenes humanos transfectados Esta estratégia para clonar o oncogene presente no carcinoma humano de bexiga dependeu da presença das sequências *Alu* (segmentos em vermelho), que estão presentes em quase um milhão de cópias espalhadas pelo genoma humano (segmentos em cor laranja). Como consequência, virtualmente todos os genes humanos estão intimamente relacionados com uma ou mais das sequências *Alu*. Se o DNA genômico de uma célula tumoral humana que carrega um oncogene (segmento em azul) é transfectada para dentro de uma célula de camundongo (cujo DNA [linha em marrom-claro] não tem sequências intimamente relacionadas às sequências humanas), o DNA humano introduzido pode ser detectado pelo uso de uma sonda específica para *Alu* em procedimentos de *Southern blotting* (veja a Figura 4.4). Como tantas sequências humanas *Alu* foram co-introduzidas juntamente com o oncogene humano para dentro de uma célula de camundongo transformada inicialmente, o DNA deste transformante foi extraído, fragmentado e usado em um segundo ciclo de transfecções, mais uma vez para dentro de células de camundongo. O único DNA humano e sequências *Alu* associadas que estavam presentes em células transformadas secundariamente foram aqueles que estavam intimamente relacionados ao oncogene humano (cuja presença foi selecionada por causa do fenótipo transformado que ele causou naquelas células). Uma biblioteca genômica pôde então ser feita a partir do DNA desses transformantes secundários, e o clone de DNA contendo o oncogene pôde ser identificado (usando uma sonda específica para *Alu*), resultando na clonagem do oncogene do carcinoma de bexiga.

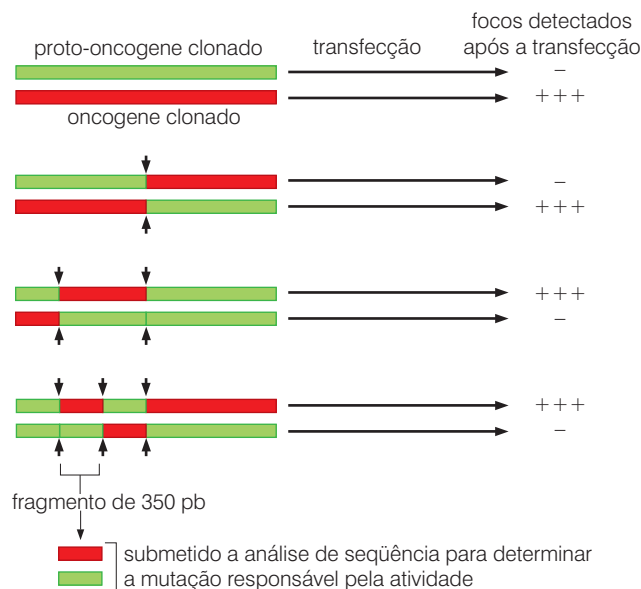


Figura 4.9 Localização de uma mutação ativadora de oncogene Os DNAs clonados de um oncogene de carcinoma humano de bexiga (segmentos em vermelho) e o proto-oncogene humano H-ras intimamente relacionado (segmentos em verde) foram clivados por enzimas de restrição nos sítios indicados (setas verticais), e genes recombinantes foram sintetizados pela ligação (união) dos fragmentos de DNA resultantes a partir das duas fontes e testando as moléculas híbridas de DNA para sua atividade transformadora usando o ensaio de transfecção-foco (veja a Figura 4.2). Isso tornou possível localizar progressivamente a mutação responsável pela ativação do oncogene em um pequeno segmento de 350 pares de bases, que então poderia ser submetido a uma análise de sequência para determinar as alterações precisas da sequência que distinguiram as duas versões alélicas deste gene. (A partir de C.J. Tabin et al., *Nature* 300:143-149, 1982.)

to-oncogene clonado com outros segmentos que derivam a partir do oncogene (Figura 4.9). Isso tornou possível limitar as diferenças críticas para um segmento de apenas 350 pares de base de comprimento.

O “quebra-cabeça” foi finalmente resolvido quando os segmentos de 350 pb correspondentes, a partir do proto-oncogene e do oncogene, foram submetidos a uma análise da sequência de DNA. A diferença crítica foi extraordinariamente sutil – uma única substituição de base na qual um resíduo G (guanosina) no proto-oncogene foi substituído por um T (timidina) no oncogene. A substituição de apenas uma base – uma **mutação pontual** – pareceu ser tudo que era necessário para converter o gene normal em um potente oncogene (Figura 4.10)! Essa descoberta importante foi realizada simultaneamente em três laboratórios, eliminando todas as dúvidas sobre a sua exatidão.

A descoberta dessa mutação pontual representou um marco significativo na pesquisa do câncer. Foi a primeira vez que uma mutação foi descoberta em um gene que casualmente contribuiu para o crescimento neoplásico de um câncer humano. Igualmente importante, pareceu que essa alteração genética surgiu como uma mutação somática.

Com essa informação em mãos, pesquisadores puderam desenvolver uma provável explicação para a origem do carcinoma de bexiga e, por extensão, de outros tumores similares. Foi dito que o determinado carcinoma de bexiga, a partir do qual o oncogene H-ras foi clonado, teve

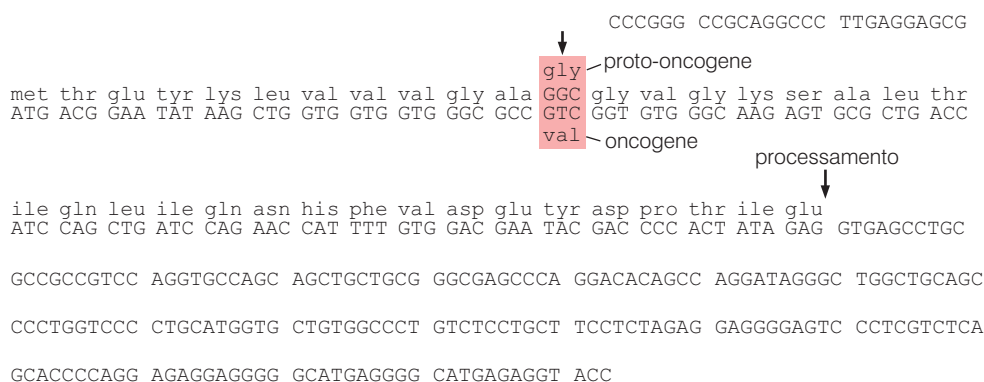


Figura 4.10 Mutação responsável pela ativação do oncogene H-ras Como indicado na Figura 4.9, a diferença crítica entre o oncogene de carcinoma humano de bexiga e seu proto-oncogene poderia estar localizada em um fragmento subgênico de 350 pares de bases. As sequências dos dois fragmentos de DNA, do oncogene e do proto-oncogene, com 350 nucleotídeos de comprimento, foram então determinadas. As duas diferem em um único nucleotídeo, que afetou o 12º códon da fase de leitura (seta) de H-ras, convertendo o normalmente presente códon que codifica para glicina em um que codifica para valina. (A partir de C.J. Tabin et al., *Nature* 300:143-149, 1982.)

origem em um homem de meia idade que esteve fumando por quatro décadas. Durante esse tempo, os carcinógenos presentes na fumaça dos cigarros foram introduzidos em grandes quantidades em seus pulmões e passaram de lá pela corrente sanguínea até seus rins, que excretaram tais espécies químicas com a urina. Quando na bexiga, algumas das moléculas carcinogênicas presentes na urina penetraram nas células que a revestem e atacaram o seu DNA. Em uma ocasião, um carcinógeno mutagênico introduziu uma mutação pontual no proto-oncogene *H-ras* de uma célula epitelial. Desde então, essa célula mutante e suas descendentes proliferaram sem controle, sendo dirigidas pela ação transformante potente do oncogene *H-ras* que elas carregavam. O resultado, anos mais tarde, foi uma grande massa tumoral que foi finalmente diagnosticada.

Um dado importante é que a substituição de par de base ocorreu na **fase de leitura** do gene *H-ras* – a porção do gene dedicada a codificar a sequência de aminoácidos (veja a Figura 4.10). Em particular, essa mutação pontual causou a substituição de um resíduo de glicina presente na proteína codificada por *H-ras* normal por um resíduo de valina. Os efeitos dessa substituição de aminoácidos na função da oncoproteína *H-ras* serão discutidos mais tarde nos Capítulos 5 e 6.

A descoberta dessa mutação pontual estabeleceu um mecanismo para ativação de oncogene que era bem diferente daquele responsável pela criação dos oncogenes *myc*. No caso do *H-ras*, uma alteração na estrutura da proteína codificada pareceu ser crítica. No caso contrário de *myc*, a desregulação da sua expressão pareceu ser importante para lhe passar as forças oncogênicas.

Dentro de uma década, observou-se um grande número de tumores humanos que carregam mutações pontuais em um dos três genes *ras* presentes no genoma de mamíferos: *H-ras*, *K-ras* e *N-ras*. Significativamente, em cada um desses tumores, a mutação pontual que foi descoberta estava presente em um dos três códons específicos na fase de leitura de um gene *ras*. Como consequência, observou-se que todas as oncoproteínas Ras (feitas tanto pelo gene *H*, *K* ou *N-ras*) carregavam substituições de aminoácidos nos resíduos 12, 61 ou (menos frequentemente) 13. Concluindo, mais de 20% dos tumores humanos que surgem em uma variedade de tecidos carregam tais genes *ras* com mutação pontual (Tabela 4.2).

Ambos os mecanismos de ativação – regulatório e estrutural – podem colaborar para criar um oncogene ativo. No caso do oncogene *myc* carregado pelo vírus da mielocitomatose aviária, por exemplo, observou-se que a expressão desse gene era muito desregulada pelo promotor da transcrição do vírus. Ao mesmo tempo, algumas sutis alterações na fase de leitura do oncogene *myc* (e, portanto, alterações na estrutura da sua oncoproteína codificada, Myc) mais adiante aumentaram as forças transformantes, já potentes. Similarmente, foi observado

TABELA 4.2 Uma lista de oncogenes *ras* com mutações pontuais carregadas por uma variedade de células tumorais humanas

Tipo de tumor	Proporção (%) de tumores que carregam um gene <i>ras</i> com mutação pontual ^a
Pâncreas	90 K
Tireóide (papilar)	60 (H, K, N)
Tireóide (folicular)	55 (H, K, N)
Colorretal	45 (K)
Seminoma	45 (K, N)
Mielodisplasia	40 (N, K)
Pulmão (de célula não-pequena)	35 (K)
Leucemia mielógena aguda	30 (N)
Fígado	30 (N)
Melanoma	15 (K)
Bexiga	10 (K)
Rins	10 H

^aH, K, e N referem aos genes humanos *H-RAS*, *K-RAS* e *N-RAS*, respectivamente.

que o oncogene *H-ras* carregado pelo vírus do sarcoma de Harvey carrega uma mutação pontual na sua fase de leitura (como aquela descoberta no oncogene do carcinoma de bexiga); ao mesmo tempo, ele foi muito superexpresso, sendo dirigido pelo promotor transcricional do retrovírus.

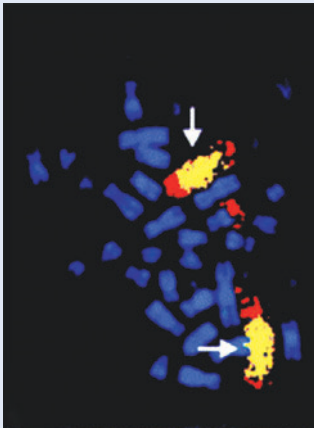
4.5 Variações de um tema: o oncogene *myc* pode surgir por via de ao menos três mecanismos adicionais distintos

A observação de que o oncogene *v-myc* do vírus da mielocitomatose aviária (AMV) surgiu devido à desregulação da sua expressão apenas sugere os diversos mecanismos que são capazes de criá-lo. Como citado na Seção 4.3, em alguns tumores humanos, a expressão do gene *myc* continua sendo dirigida pelo seu próprio promotor transcricional natural, mas foi observado que o número de cópias desse gene estava aumentado para níveis muitas vezes acima do que as duas cópias presentes no genoma humano normal. Em 30% dos neuroblastomas da infância, um parente próximo de *c-myc*, chamado de *N-myc*, também pareceu estar amplificado, especificamente nos tumores mais agressivos desse tipo (Barra Lateral 4.5). Em ambos os casos, o número de cópias aumentadas do gene resulta em aumentos correspondentes no nível dos produtos dos genes – as proteínas Myc e N-Myc. Como discutiremos mais tarde, no Capítulo 8, proteínas da família Myc possuem potentes forças promotoras de crescimento. Como consequência, quando presentes em níveis excessivos, essas proteínas parecem direcionar a proliferação celular descontrolada.

É importante observar as notações que são utilizadas aqui e por todo este texto. Oncogenes não-humanos são normalmente escritos como palavras de três letras minúsculas em itálico

Barra Lateral 4.5 A amplificação de *N-myc* e os neuroblastomas de infância A amplificação do gene *N-myc* ocorre em cerca de 40% dos neuroblastomas pediátricos avançados, que são tumores do sistema nervoso periférico. Essa amplificação, que está associada com a formação de minutos duplos (DMs) ou regiões homogeneamente coradas (HSRs), representa um mal prognóstico para o paciente (Figura 4.11). Com frequência, observa-se que as HSRs, que contêm múltiplas cópias da região genômica ao redor do gene *N-myc*, foram deslocadas da posição cromossomal normal de *N-myc* e, em um estudo, associou-se com no mínimo outras 18 regiões cromossômicas diferentes. Por razões desconhecidas, a amplificação do gene *N-myc* leva a uma distribuição bimodal das cópias do gene, sendo que alguns tumores têm de 10 a 30 cópias de genes, enquanto outros carregam 100 a 150. Originalmente, contudo, acreditava-se que a amplificação de *N-myc* fosse uma peculiaridade de neuroblastomas (e assim um marcador de diagnóstico específico para essa doença em particular), ela agora foi observada em uma variedade de tumores neuroectodermas, incluindo astrocitomas e retinoblastomas; além disso, carcinomas pulmonares de células pequenas, que têm características neuroendócrinas, frequentemente também exibem genes *N-myc* amplificados.

(A)



(B)

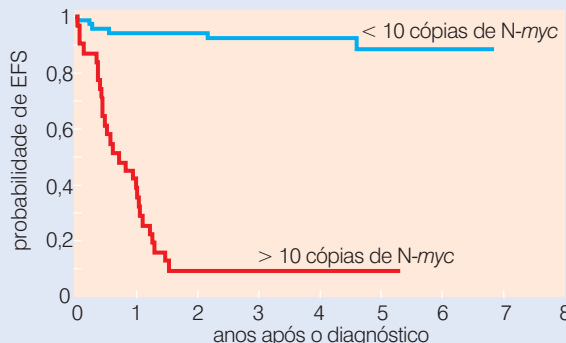


Figura 4.11 Amplificação de *N-myc* e prognóstico de neuroblastoma (A) O gene *N-myc* é frequentemente amplificado em neuroblastomas da infância humana. Múltiplas cópias desse gene foram detectadas (amarelo) pela técnica de hibridização *in situ* por fluorescência (FISH). O fato de elas estarem presentes, dispostas repetidamente em sequência, dentro dos cromossomos (amarelo) significa que elas constituem regiões homogeneamente coradas (HSRs) em vez de partículas extracromossômicas – minutos duplos (DMs) –, que também são frequentemente observadas nestes tumores. (B) Este gráfico de Kaplan-Meier ilustra a sobrevivência livre de eventos (EFS) de crianças que sofrem de neuroblastoma, isto é, nenhuma observação ou ocorrência clinicamente significativa relacionada ao câncer nos anos indicados seguidos do diagnóstico inicial e do tratamento. Aqueles que tiveram amplificação mínima ou nenhuma de *N-myc* têm um prognóstico muito bom e eventos clínicos mínimos, enquanto aqueles que têm uma amplificação extensiva de *N-myc* têm um prognóstico muito pior e, assim, tempos de sobrevivência mais curtos após o diagnóstico. (A, a partir de C. Lengauer et al., *Nature* 396:643-649, 1998; B, a partir de M.L. Schmidt et al., *J. Clin. Oncol.* 18:1260-1268, 2000.)

Tabela 4.3 Algumas regiões cromossômicas frequentemente amplificadas e os genes que sabidamente eles carregam

Nome do oncogene ^a	Localização no cromossomo humano	Cânceres humanos	Natureza da proteína
<i>erbB1</i>	7q12-13	glioblastomas (50%); carcinomas de células escamosas (10-20%)	RTK
<i>cab1-erbB2-grb7</i>	17q12	carcinomas de estômago, de ovário e de mama (10-25%)	RTK, proteína adaptadora
<i>k-sam</i>	7q26	carcinomas de estômago e de mama (10-20%)	RTK
<i>FGF-R1</i>	8p12	carcinomas de mama (10%)	RTK
<i>met</i>	7q31	carcinomas de estômago (20%)	RTK
<i>K-ras</i>	6p12	carcinomas de pulmões, de ovário e de bexiga (5-10%)	proteína G pequena
<i>N-ras</i>	1p13	cânceres de cabeça e pescoço (30%)	TF
<i>c-myc</i>	8q24	carcinomas, várias leucemias (10-50%)	TF
<i>L-myc</i>	1p32	carcinomas de pulmões (10%)	TF
<i>N-myc-DDX1</i>	2p24-25	neuroblastomas, carcinomas de pulmões (30%)	TF
<i>akt-1</i>	14q32-33	cânceres de estômago (20%)	ser/thr cinase
<i>ciclina D1-exp1-hst1-ems1</i>	(11q13)	carcinomas de mama e de células escamosas (40-50%)	ciclina G1
<i>cdk4-mdm2-sas-gli</i>	12q13	sarcomas (40%)	CDK, antagonista de p53
<i>ciclina E</i>	19q12	cânceres de estômago (15%)	ciclina
<i>akt2</i>	(19q13)	cânceres de pâncreas e ovários (30%)	ser/thr cinase
<i>AIB1, BTAK</i>	(20q12-13)	cânceres de mama (15%)	receptor co-ativador
<i>cdk6</i>	(19q21-22)	gliomas (5%)	CDK
<i>myb</i>	6q23-24	carcinoma de cólon, leucemias	TF
<i>ets-1</i>	11q23	linfoma	TF
<i>gli</i>	12q13	glioblastomas	TF
<i>FGFR2</i>	10q26	carcinomas de mama	RTK

^aA listagem de vários genes indica a freqüente co-amplificação de um número de genes intimamente relacionados; apenas os produtos dos genes mais freqüentemente amplificados estão descritos na coluna da direita.

Cortesia de M. Tereda, Tokyo, e adaptada de G.M. Cooper, *Oncogenes*, 2nd ed. Boston and London: Jones and Bartlett, 1995.

(p. ex., *myc*) enquanto seus produtos protéicos são escritos em fonte romana com a letra inicial maiúscula (p. ex., *Myc*). O próprio proto-oncogene *myc* é freqüentemente chamado de *c-myc* para distingui-lo dos seus dois genes primos, *N-myc* e *L-myc*. Para tornar o assunto mais confuso, os genes humanos seguem uma nomenclatura diferente, de modo que o gene *myc* humano é escrito *MYC*, e o seu produto protéico, *MYC*. Neste livro, geralmente usaremos as convenções de acrônimos de não-humanos.

O processo de amplificação gênica, que é responsável pelos aumentos no número de cópias *myc*, ocorre pela replicação preferencial de uma região limitada do DNA cromossomal, não afetando as regiões cromossômicas mais distantes (veja a Figura 4.7). Uma vez que a região do DNA cromossomal que sofre a amplificação – o amplicon – em geral inclui uma extensão de DNA mais longa do que o gene *c-myc* ou o *N-myc* (p. ex., normalmente incluindo 0,5 a 10 megabases de DNA), as regiões cromossômicas amplificadas são, com freqüência, grandes o suficiente para serem observadas na metáfase da mitose por um microscópio óptico. Freqüentemente a amplificação gênica gera grandes disposições lineares repetidas ao longo das regiões cromossômicas que aparecem como regiões homogeneamente coradas (HSRs) ao microscópio (veja a Figura 1.12). De forma alternativa, a região cromossomal que carrega um gene *myc* ou *N-myc* poderá ser desligada do cromossomo e poderá ser vista como partículas extracromossômicas pequenas de replicação independente (minutos duplos; veja a Figura 1.12). Na verdade, agora sabemos que um número de proto-oncogenes pode ser encontrado em um número amplificado de cópias de genes em vários tipos de tumores humanos (Tabela 4.3).

Uma maneira mais incomum de desregular os níveis de expressão de *myc* já foi citada (veja a Seção 3.11). Lembre que o mecanismo de mutagênese de inserção faz com que a expressão do proto-oncogene *c-myc* seja colocada sob o controle transcricional de um pró-vírus ALV que se integrou por perto no DNA cromossomal. A superexpressão constitutiva resultante do RNA de *c-myc* e dessa forma da proteína *Myc* resultou, mais uma vez, na inundação da célula com um excesso de sinais promotores do crescimento.

Tal ativação pela integração de pró-vírus sugeriu uma maneira mais geral de ativação do proto-oncogene *c-myc*: mesmo enquanto continua a residir no seu sítio cromossomal nor-

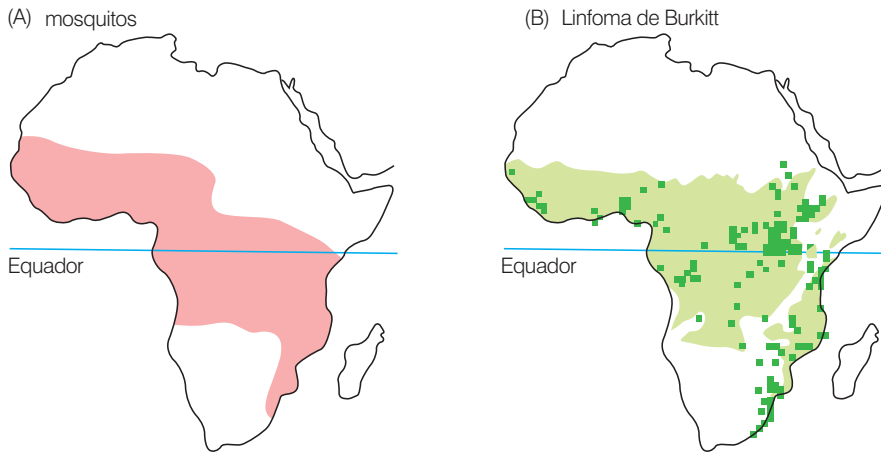


Figura 4.12 Incidência do linfoma de Burkitt na África (A) A distribuição geográfica do mosquito *Aedes simpsoni* pela África, o qual se sabia ser um vetor na transmissão da malária. (B) A distribuição geográfica do linfoma infantil de Burkitt (BL), como originalmente documentado por Dennis Burkitt. Os dois mapas de distribuição são grosseiramente congruentes, o que sugeriu que a infecção por malária poderia ter sido um fator etiológico nesse linfoma. Além disso, a presença invariável do genoma do vírus Epstein-Barr (EBV) nas células tumorais BL indica um segundo fator etiológico. Como as células tumorais evoluem, uma translocação cromossomal envolvendo o gene *c-myc* se desenvolve, o que contribui para a proliferação neoplásica dos linfócitos B infectados por EBV. (A e B, a partir de A.J. Haddow, em D.P. Burkitt and D.H. Wright (eds), *Burkitt's Lymphoma*. Edinburgh and London: E. & S. Livingstone Co. and Baltimore: Williams and Wilkins.)

mal, *c-myc* pode envolver-se no desenvolvimento de câncer caso fique sob o controle de promotores transcrpcionais estranhos. Na doença do linfoma de Burkitt (BL), esse princípio foi validado de uma forma mais dramática. Esse tumor ocorre com alguma frequência entre crianças jovens no leste e no centro da África (Figura 4.12). Os agentes etiológicos dessa doença incluem infecções crônicas pelo vírus de Epstein-Barr (EBV, um parente distante do herpesvírus humano; Seção 3.4) e por parasitas da malária.

Nenhum desses fatores etiológicos emitiu uma luz na natureza de uma mudança genética crítica dentro das células do linfoma de Burkitt que seja responsável pela proliferação fora de controle destas células. Entretanto, um exame cuidadoso da distribuição dos cromossomos na metáfase das células tumorais revelou uma pista impressionante: as células tumorais quase que invariavelmente carregavam **translocações** cromossomais (veja também a Figura 2.23). Tais alterações fusionaram a região de um cromossomo com uma outra região de um segundo cromossomo não-relacionado (Figura 4.13). Obser-

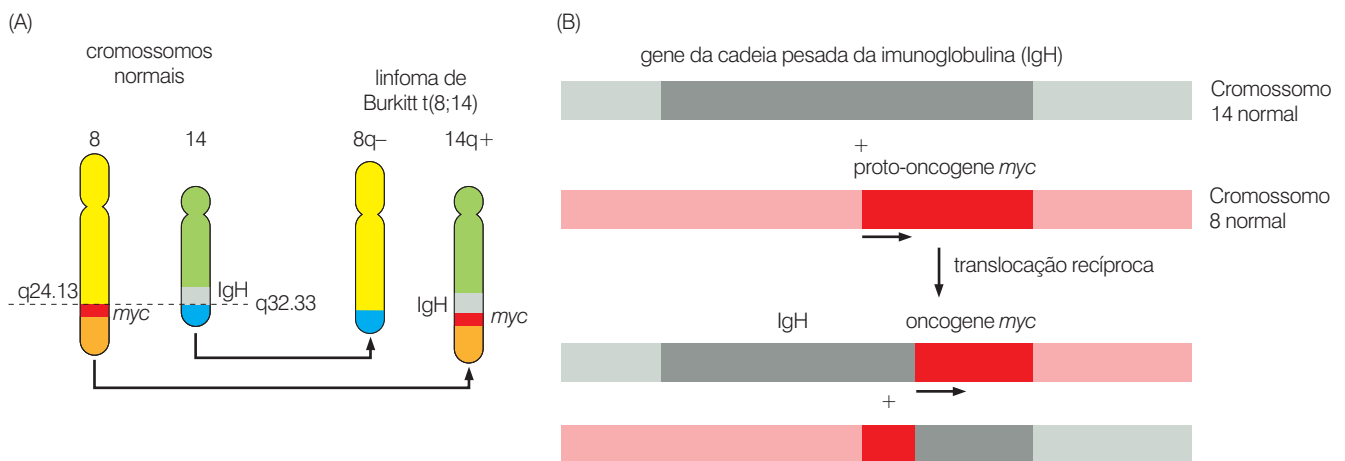


Figura 4.13 Translocação cromossomal no linfoma de Burkitt (A) No genoma das células do linfoma de Burkitt (BL), a expressão do gene *c-myc* está sob o controle das seqüências estimuladoras controladoras da transcrição de um gene de imunoglobulina como consequência direta das translocações cromossomais recíprocas. Essas translocações justapuseram genes de imunoglobulinas no Cromossomo 2, 14 ou 22 com o gene *myc* no Cromossomo 8. (Elas ocorrem em 9% [cadeia κ], 16% [cadeia λ] e 75% [cadeia pesada] das BLs, respectivamente.) A translocação mais comum, t(8;14), está mostrada aqui. (B) Está descrito um mapa genômico do evento de translocação que coloca o gene *c-myc* (retângulo vermelho) no

Cromossomo 8 sob o controle das seqüências das cadeias pesadas de imunoglobulinas (IgH; retângulo cinza) presentes no Cromossomo humano 14. Como as seqüências estimuladoras de imunoglobulinas direcionam para uma alta expressão constitutiva, a modulação normal da expressão de *myc* em resposta a sinais fisiológicos está anulada. O oncogene *myc* resultante inicialmente faz proteínas Myc com estrutura normal, mas em quantidades anormalmente altas. (Mutações pontuais que ocorrem subsequencialmente na fase de leitura de *myc* podem, mais adiante, potencializar a função da oncoproteína Myc.) (A partir de P. Leder et al., *Science* 222:765-771, 1983.)

vou-se que translocações como essas freqüentemente são *recíprocas*, no sentido que uma região cromossomal do cromossomo A aterrisse no cromossomo B, enquanto o segmento deslocado do cromossomo B terminará ligado ao cromossomo A. No caso dos linfomas de Burkitt, três translocações cromossomais distintas alternativas foram encontradas, envolvendo os Cromossomos humanos 2, 14 ou 22. As três translocações foram unidas pelo fato de que, em cada caso, a região de um desses três cromossomos foi fusionada com uma seção do Cromossomo 8.

Em 1983, pesquisadores perceberam que o proto-oncogene *myc* poderia ser encontrado na região do Cromossomo 8 que está envolvida nesses três tipos distintos de translocação. No outro lado do sítio de fusão (muitas vezes chamado de **ponto de quebra** do cromossomo), foram encontradas as seqüências promotoras da transcrição de qualquer um dos três genes distintos de **imunoglobulina** (anticorpo). Assim, o agrupamento do gene da cadeia pesada da imunoglobulina é encontrado no Cromossomo 14, o gene da cadeia leve do anticorpo κ é encontrado no Cromossomo 2 e o gene da cadeia leve do anticorpo λ é encontrado no Cromossomo 22. (Existem evidências claras de que as enzimas responsáveis pelo arranjo das seqüências de genes de anticorpos durante o desenvolvimento do sistema imune ocasionalmente perdem especificidade e, em vez de criarem um gene de anticorpo rearranjado, sem cuidado fusionam parte de um gene de anticorpo com o proto-oncogene *myc*.) De forma parentética, nada disso explica o papel de EBV na patogênese do linfoma de Burkitt (Barra lateral 4.6).

Repentinamente, o grande esquema que sustenta estas alterações cromossomais complexas tornou-se claro, e era simples: tais translocações separaram o gene *myc* do seu promotor transcricional normal e o colocaram, por sua vez, sob o controle de um dos três reguladores de transcrição altamente ativos (veja a Figura 4.13). Uma vez que a sua expressão está submetida aos promotores de genes de anticorpos, *myc* se torna um oncogene potente e dirige a proliferação das células linfóides nas quais esses promotores da transcrição são muito ativos. Como consequência, a proliferação de uma célula rara que porventura tenha adquirido um gene *myc* desregulado como esse será muito favorecida.

Desde tais descobertas, observou-se que quase uma dúzia de translocações cromossomais distintas causava a expressão desregulada de proto-oncogenes conhecidos; a maioria desses genes permanece pouco caracterizada (Tabela 4.4). Ao todo, mais de 300 translocações distintas recorrentes (i. e., aquelas que têm sido encontradas em múltiplos tumores humanos que surgem independentemente) têm sido catalogadas, e mais de 100 dos novos genes híbridos criados por estas translocações têm sido isolados por clonagem molecular.

Barra Lateral 4.6 Como o vírus de Epstein-Barr (EBV) causa câncer? A descoberta, em 1982, das translocações cromossomais associadas ao linfoma de Burkitt emitiram um pouco de luz sobre o mecanismo preciso pelo qual fatores etiológicos (infecções crônicas de EBV e por parasitas da malária) favorecem a formação desses tumores. As contribuições de cada um desses agentes para a patogênese do linfoma ainda não estão totalmente claras. Parece que infecções crônicas de malária podem comprometer as defesas imunes de crianças e, assim, torná-las suscetíveis a infecções fora de controle de EBV. Isso, por sua vez, pode levar ao acúmulo de grandes quantidades de linfócitos B imortalizados por EBV que são levados a proliferar continuamente pelo vírus. Em algumas dessas células, quando a maquinaria enzimática dedicada a organizar erros normais dos rearranjos de genes de imunoglobulinas faz o seu papel, ela

ocasionalmente cria justaposições inapropriadas de segmentos de genes de anticorpos com o proto-oncogene *c-myc*. Os oncogenes *myc* resultantes, em conjunto com vários genes (possivelmente oncogenes) expressados por EBV, então dirigem a proliferação celular que levou finalmente ao aparecimento de linfomas. Um “quebra-cabeça” adicional surge do envolvimento de EBV nos carcinomas nasofaríngeos (NPCs) no Sudeste da Ásia, onde esta infecção viral, juntamente com certos fatores do estilo de vida (possivelmente o consumo de peixe salgado ao estilo chinês desde cedo na vida), foram envolvidos como agente etiológicos. Ainda mais complicado é o fato de que em populações ocidentais, a infecção por EBV é comum e causa mononucleose em indivíduos **imunocompetentes** (i. e., aqueles com um sistema imune totalmente funcional), desencadeando malignidade apenas em raros momentos.

Tabela 4.4 Translocações em tumores humanos que desregulam a expressão de proto-oncogenes e, desse modo, criam oncogenes

Oncogene	Neoplasma
<i>myc</i>	linfoma de Burkitt; outras malignidades de células B e T
<i>bcl-2</i>	linfomas de células B foliculares
<i>bcl-3</i>	linfomas crônicos de células B
<i>bcl-6</i>	linfomas difusos de células B
<i>hox1</i>	leucemia aguda de células T
<i>lyl</i>	leucemia aguda de células T
<i>rhom-1</i>	leucemia aguda de células T
<i>rhom-2</i>	leucemia aguda de células T
<i>tal-1</i>	leucemia aguda de células T
<i>tal-2</i>	leucemia aguda de células T
<i>tan-1</i>	leucemia aguda de células T

Adaptada de G.M. Cooper, *Oncogenes*, 2nd ed. Boston and London: Jones and Barlett, 1995.

Em resumo, todos os três caminhos alternativos para ativar o proto-oncogene *c-myc* – pela integração do provírus, amplificação gênica ou translocação cromossomal – convergem para um tema mecanicamente comum. Invariavelmente, o gene está privado da sua regulação fisiológica normal e é forçado então a ser expresso em altos níveis constitutivos.

Em geral, os mecanismos que levam à superexpressão de genes nas células cancerosas permanecem pouco compreendidos. Algumas superexpressões, como indicadas aqui, são alcançadas por amplificação gênica e translocação cromossomal. Mas até mesmo mais frequentemente, genes que estão presentes na configuração normal e em número de cópias normal são transcritos em níveis muito excessivos nas células cancerosas pela ação de fatores de transcrição desregulados; os últimos são pouco caracterizados. Para complicar o assunto, outros genes que são encontrados amplificados nos genomas das células cancerosas nem sempre são superexpressos (Barra Lateral 4.7); essa observação indica que a amplificação gênica por si só não constitui evidência que prove que um gene tenha um papel-chave na orientação da proliferação de células cancerosas.

4.6 Uma disposição diversa de alterações estruturais em proteínas também pode levar a ativação de oncogenes

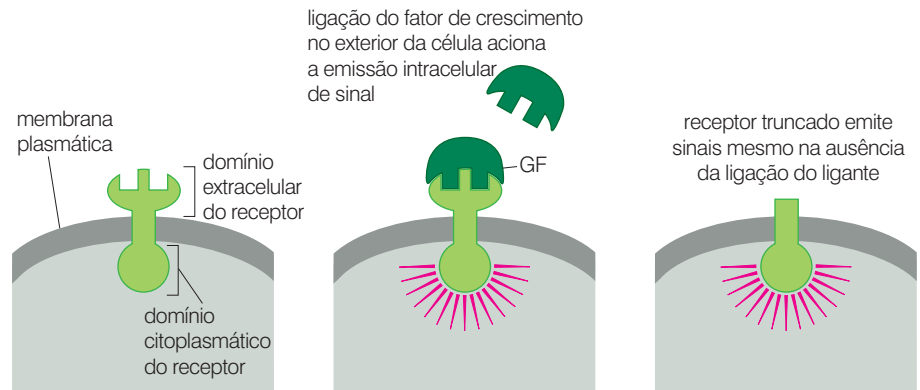
Observou-se que a mutação pontual descoberta nos genes *ras* foi a primeira de várias mutações que afetavam as estruturas das proteínas codificadas pelos proto-oncogenes e que as convertia em oncoproteínas ativas. Como um exemplo importante, a formação de certos tumores humanos, como os carcinomas gástricos e de mama e tumores do glioblastoma de cérebro (também chamados de gliomas) envolve a proteína que serve como **receptor** de superfície da célula para o fator de crescimento epidermal (EGF). Como discutiremos em detalhes no próximo capítulo, essa proteína receptora se estende do espaço extracelular através da membrana plasmática das células para dentro do seu citoplasma. Em geral, o receptor EGF, como quase 60 receptores similarmente estruturados, reconhece a presença do seu **ligante** análogo (i. e., EGF) no espaço extracelular e, em resposta, o informa para o interior da célula. Entretanto, em cerca de um terço dos glioblastomas examinados, observou-se que o receptor EGF estava decapitado, sem a maior parte do seu domínio extracelular (Figura 4.14). Agora sabemos que tais receptores truncados emitem sinais estimuladores do crescimento para dentro das células, mesmo na ausência de qualquer EGF. Agindo assim, eles atuam como oncoproteínas para orientar a proliferação celular. No Capítulo 5, descreveremos mais precisamente como alterações estruturais dos receptores de fatores de crescimento os convertem em oncoproteínas potentes.

Um tipo de translocação cromossomal completamente diferente daquela encontrada nas células do linfoma de Burkitt é observado na maioria dos casos (> 95%) de leucemia **mielógena**

Barra Lateral 4.7 Amplificação gênica nem sempre leva a superexpressão Análises sistemáticas recentes de regiões cromossomais em genomas de células tumorais e dos níveis de expressão dos genes dentro dessas regiões indicaram que o número de cópias de um gene nem sempre prediz o seu nível de expressão. Em vez disso, tais análises mostraram que mesmo que um grupo de genes sofra aumentos significativos no número de cópias – amplificação gênica – apenas 40 a 60% desses genes mostrarão aumentos correspondentes nos seus transcritos de RNA (e, assim, das proteínas). Essas observações indicam que os níveis de expressão de vários genes são regulados por mecanismos de retroalimentação negativa, os quais funcionam para assegurar níveis fisiologicamente apropriados de expressão, mesmo na presença de cópias excessivas desses genes. Tais mecanismos de retroalimentação, que frequentemente operam controlando as atividades de vários fatores de transcrição, ditam que a superexpressão de certos genes apenas pode ser alcançada pela desregulação dos fatores de transcrição ou por alterações dos promotores dos genes aos quais estes fatores se ligam.

Figura 4.14 Emissão desregulada dos receptores de fatores de crescimento

Normalmente, os receptores de fatores de crescimento localizados na membrana plasmática de uma célula liberam sinais para interior da célula apenas quando o domínio extracelular do receptor estiver ligado ao fator de crescimento apropriado (GF; i. e., o “ligante” do receptor). Entretanto, se o domínio extracelular de certos receptores é deletado por causa de uma mutação no gene que codifica para o receptor ou por *splicing* alternativo do pré-mRNA do receptor, a proteína receptora truncada resultante emite sinais para dentro da célula sem a ligação do fator de crescimento ligante.



crônica (CML), uma malignidade derivada da medula óssea. Diferentemente do caso do gene *myc* nos linfomas de Burkitt, essas translocações levam à fusão de duas fases distintas de leitura – uma descoberta feita no mesmo ano (1982) que os genes do linfoma de Burkitt foram primeiramente caracterizados em nível molecular. Agora, a consequência dessa translocação é uma fase de leitura aumentada que codifica para a estrutura de uma proteína híbrida (veja a Figura 2.23).

De um lado do ponto de quebra da translocação, são encontradas seqüências que codificam para a proteína sintetizada pelo proto-oncogene *abl*; o gene *abl* foi originalmente descoberto em virtude da sua presença como um oncogene adquirido no vírus da leucemia murina de Abelson (do inglês, *Abelson murine leukemia virus*), um retrovírus rapidamente tumorigênico (veja a Tabela 3.3). Foi observado que o gene *abl*, que se localiza no Cromossomo 9q34 (i. e., a quarta banda da terceira região do braço longo do Cromossomo humano 9), se encontra, após o exame de vários tumores, fusionado com seqüências que estão agrupadas em uma região próxima em 22q11 (Figura 4.15). [A notação-padrão utilizada aqui é t(9;22)(q34;q11), em que t significa uma translocação, q, o braço longo, e p, o braço curto de um cromossomo.] Essa área no Cromossomo 22 foi chamada de região de quebra de agrupamento (do inglês, *breakpoint cluster region*) – portanto, *bcr*. Subseqüentemente, todas essas regiões de quebra foram encontradas dentro do gene *bcr*. A fusão resultante das seqüências de aminoácidos de Abl com Bcr desregula a proteína Abl, normalmente bem-controlada, levando-a a emitir sinais de promoção do crescimento de uma forma forte e desregulada.

Desde a descoberta da translocação *bcr-abl*, dúzias de outras translocações bastante diferentes têm sido documentadas, que também resultam na formação de proteínas híbridas (p. ex., Tabela 4.5). Quase todas foram encontradas nas malignidades hematopoiéticas, notavelmente leucemias e linfomas. Como cada um desses tipos de translocações foi encontrado apenas raramente, a função de várias das proteínas fusionadas resultantes permanece obscura.

4.7 Sinopse e perspectivas

No final dos anos 1970, diferentes linhas de evidência que dizem respeito aos genes de câncer foram unidas em uma idéia relativamente simples. Os genomas de mamíferos e aves contêm um grupo de proto-oncogenes, que funcionam para regular a proliferação e diferenciação normal das células. Alterações desses genes que afetam o controle da sua expressão ou a estrutura das suas proteínas codificadas podem levar ao excesso de genes ativos promotores do crescimento. Uma vez formados, tais oncogenes procedem a direcionar a multiplicação celular e, assim, têm um papel central na patogênese do câncer.

Vários desses genes celulares foram originalmente identificados pela sua presença nos genomas dos retrovírus que se transformam rapidamente, como o vírus do sarcoma de Rous, o vírus da eritroblastose aviária e o vírus do sarcoma de Harley. Subseqüentemente, experimentos de transfecção revelaram a presença de genes transformantes potentes nos genomas de células que foram transformadas pela exposição a carcinógenos químicos e células derivadas de tumores humanos que surgem espontaneamente. Essas células tumorais não têm associação com infecções por retrovírus. No entanto, foi observado que os oncogenes que elas carregam estão relacionados com aqueles carregados pelos retrovírus transformantes. Isso significa que um repertório comum de proto-oncogenes poderia ser ativado por duas rotas alternativas: aquisição de retrovírus ou mutação somática.

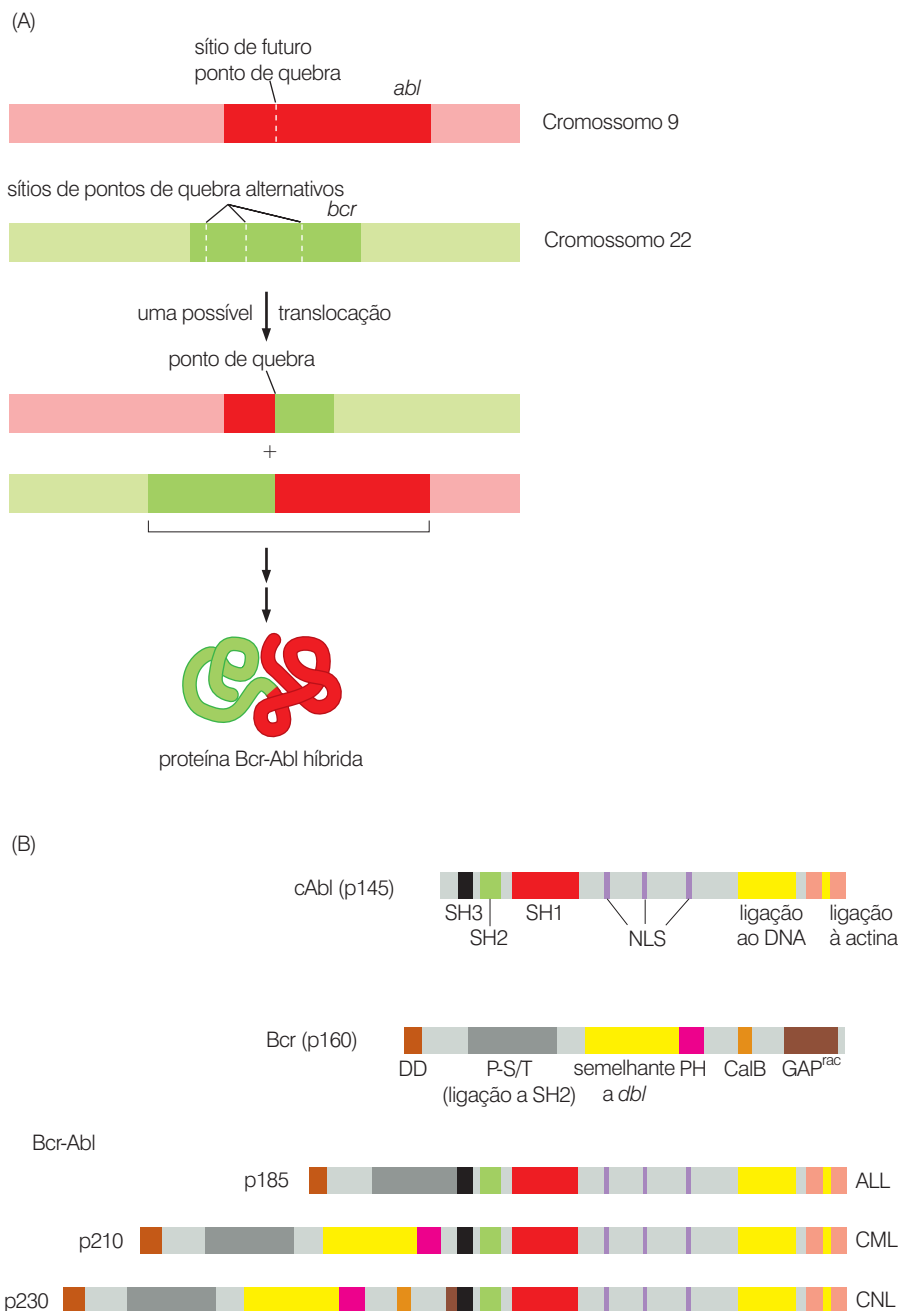


Figura 4.15 Formação do oncogene *bcr-abl*

(A) Translocação cromossomal recíproca entre os Cromossomos humanos 9 e 22, que carregam os genes *abl* e *bcr*, respectivamente, resulta na formação de genes híbridos fusionados que codificam para as proteínas híbridas Bcr-Abl. (B) Como indicados aqui, diferentes pontos de quebra em *bcr* são observados nas translocações cromossomais encontradas em diferentes tipos de leucemia humana – ALL, leucemia linfocítica aguda; CML, leucemia mielógena crônica; CNL, leucemia neutrofílica crônica. (As estruturas normais que codificam essas proteínas são mostradas no topo, para comparação.) A proteína cAbl e a Bcr são proteínas de multifunções com multidomínios, como indicado pelas marcas ligadas às áreas coloridas; e por isto as proteínas de fusão carregam um grande número de atividades sinalizadoras distintas. (B, adaptada de A.M. Pendergast, em A.M. Carella, Chronic Myeloid Leukemia: Biology and Treatment. London: Martin Dunitz, 2001.)

Tabela 4.5 Translocações em tumores humanos que causam a formação de proteínas de fusão oncogênicas com novas estruturas e funções

Oncogene	Neoplasma
<i>bcr/abl</i>	leucemia mielógena crônica; leucemia linfocítica aguda
<i>dek/can</i>	leucemia mielóide aguda
<i>E2A/pbx1</i>	leucemia pré-célula B aguda
<i>PML/RAR</i>	leucemia promielocítica aguda
<i>?lrg</i>	leucemia mielóide
<i>irel/urg</i>	linfoma de célula B
<i>CBFβ/MYH11</i>	leucemia mielóide aguda
<i>aml1/mtg8</i>	leucemia mielóide aguda
<i>ews/fli</i>	sarcoma de Ewing
<i>lyt-10/Cα1</i>	linfoma de célula B
<i>hrxlenl</i>	leucemias agudas
<i>hrxlaf4</i>	leucemias agudas
<i>NPM1ALK</i>	linfomas de células grandes

Adaptada a partir de G.M. Cooper, *Oncogenes*, 2 nd. Boston and London: Jones and Barlett, 1995.

As mutações somáticas que levaram à ativação dos proto-oncogenes poderiam ser divididas em duas categorias – aquelas que causaram alterações nas estruturas de proteínas codificadas e aquelas que levaram a uma expressão elevada e desregulada dessas proteínas. Mutações que afetam a estrutura incluem as mutações pontuais que afetam os proto-oncogenes *ras* e as translocações cromossômicas que geraram genes híbridos como *bcr-abl*. A expressão elevada poderia ser alcançada nos tumores humanos, por amplificação gênica ou translocação cromossômica, como aqueles que colocam o gene *myc* sob o controle das seqüências estimuladoras de imunoglobulinas.

Essas revelações sobre o controle dos genes celulares mutantes na patogênese do câncer obscureceram, durante alguns anos, as observações de que certos cânceres humanos estão associados com, e provavelmente causados por, agentes infecciosos, notavelmente vírus e bactérias. Entretanto, com a passagem do tempo, a importância das infecções na patogênese do câncer humano tornou-se clara. Como mostrado na Tabela 4.6, agora sabemos que as infecções virais estão envolvidas em causar uma variedade de cânceres humanos, alguns deles bastante comuns. Cerca de um quinto das mortes por câncer no mundo estão associadas de uma maneira ou outra a agentes infecciosos. Assim, os 9% da mortalidade mundial por câncer causada por câncer de estômago é associada a infecções de longa duração por *Helico-*

Tabela 4.6 Vírus implicados na causa do câncer humano

Vírus ^a	Família viral	Células infectadas	Malignidade em humanos	Rota de transmissão
EBV	Herpesviridae	células B células epiteliais da orofaringe linfóides	linfoma de Burkitt carcinoma nasofaríngeo	saliva saliva
HTLV-I	Retroviridae	células T	linfoma ^b linfoma não-Hodgkin	doença de Hodgkin parenteral, venérea ^c
HHV-8 ^d	Herpesviridae	células endoteliais	sarcoma de Kaposi, linfoma de cavidade corpórea	venérea
HBV	Hepadnaviridae	hepatócitos	carcinoma hepatocelular	parenteral, venérea
HCV	Flaviviridae	hepatócitos	carcinoma hepatocelular	parenteral
HPV	Papillomaviridae	epitelial cervical	carcinoma cervical	venérea
JCV ^e	Poliomaviridae	sistema nervoso central	astrocitoma, glioblastoma	?

^aA maioria dos vírus carrega um ou mais potentes genes/oncogenes promotores do crescimento. Entretanto, tais genes não foram identificados nos genomas de HBV e HCV.

^bEsses tumores, que carregam cópias dos genomas de EBV, aparecem em pacientes imunossuprimidos.

^cParenteral, origem sanguínea; venérea, via relação sexual.

^dTambém conhecido como KSHV, herpesvírus do sarcoma de Kaposi.

^eJCV (vírus JC, um parente próximo do SV40) infecta mais de 75% da população humana em torno dos 15 anos, mas os tumores da lista que contêm o vírus não são comuns. Evidências mais correlativas dão suporte no papel do JCV na transformação de células do sistema nervoso central humano, mas não há evidências de um papel de causa na formação de tumor.

Adaptada, em parte, de J. Butel, *Carcinogenesis* 21:405-426, 2000.

bacter pylori. Seis por cento da mortalidade por câncer são causados por carcinomas do fígado (hepatomas), dos quais a maioria está associada a infecções virais de hepatite B e C crônicas. E os 5% da mortalidade por câncer a partir de carcinomas cervicais é muito atribuída a infecções por papilomavírus humano (HPV).

De algum modo, temos de integrar os mecanismos carcinogênicos ativados por esses vários agentes infecciosos em um esquema maior de como os cânceres humanos surgem – um esquema que se apóia muito nas descobertas, descritas neste capítulo, dos oncogenes celulares. Em alguns momentos, as viroses infectantes introduzem oncogenes virais em células que contribuem para o fenótipo transformante. Vírus como os vírus Epstein-Barr (EBV) e herpesvírus-8 humano (HHV-8) são exemplos disso. Em outros casos, viroses semelhantes à hepatite B e hepatite C (HBV, HCV) contribuem de uma maneira menos direta para a tumorigênese. Como os dois últimos vírus não têm oncogenes e não participam na mutagênese de inserção, um terceiro mecanismo deve ser invocado: como estudaremos no Capítulo 11, estes vírus atuam pela sua habilidade de induzir lesões crônicas em tecidos e inflamações associadas.

Nos próximos dois capítulos, enfocaremos os genes celulares que desencadeiam o câncer, como uma consequência de mutações somáticas. Primeiro, as descobertas dos oncogenes celulares pareceram, por si só, prover a resposta definitiva sobre as origens e o crescimento de tumores humanos. Mas logo ficou claro que os oncogenes celulares e suas ações poderiam explicar apenas uma parte do desenvolvimento do câncer humano. Até agora, outros tipos de elementos genéticos estão claramente envolvidos na programação da proliferação fora de controle das células cancerosas. Além disso, uma compreensão definitiva do desenvolvimento do câncer dependeu da compreensão da maquinaria complexa dentro das células que permite a elas responder aos sinais promotores do crescimento liberados pelas oncoproteínas. Assim, a descoberta de oncogenes celulares foi um começo, muito importante, mas que ainda permanece um começo. Além disso, décadas de trabalho foram necessárias antes que uma compreensão mais completa da patogênese do câncer pudesse ser montada.

Conceitos-chave

- A incapacidade de encontrar viroses tumorais na maioria dos cânceres humanos, em meados dos anos 1970, deixou os pesquisadores com uma teoria principal de como a maioria dos cânceres humanos surgem: que os carcinógenos atuam como mutagênicos e funcionam mutando genes normais controladores do crescimento em oncogenes.
- Para verificar a predição desse modelo de que células transformadas carregam genes mutados que funcionam como oncogenes, uma nova estratégia experimental foi inventada: DNA de células transformadas quimicamente foi introduzido em células normais – o procedimento de transfecção –, e as células receptoras foram então monitoradas para determinar se elas também seriam transformadas.
- Culturas de células NIH 3T3 que foram transfectadas com DNA de células de camundongo quimicamente transformado geraram vários transformantes, que provaram ser tanto independentes de ancoramento como tumorogênicos; isso indicou que as células quimicamente transformadas carregam genes que poderiam funcionar como oncogenes e que oncogenes poderiam surgir nos genomas de células independentemente de infecções virais.
- Experimentos adicionais utilizando células murinas transformadas com células doadoras de tumores humanos mostraram que os oncogenes poderiam atuar através das espécies e pelas ligações de tecidos para induzir a transformação celular.
- Foi observado que os oncogenes detectados pela transfecção em células tumorais humanas e os oncogenes de retrovírus transformantes derivam de genes celulares normais pre-existent. Experimentos de hibridização de DNA provaram que o mesmo grupo de proto-oncogenes normais serviu como precursor desses dois tipos de oncogenes. Isso significou que vários dos oncogenes originalmente descobertos nos retrovírus poderiam ser encontrados em um estado mutado nos genomas celulares de tumores humanos.
- Foi observada a presença freqüente de oncogenes associados a retrovírus em elevado número de cópias em genomas de células de tumores humanos, o que sugere que a amplifi-

cação gênica resultou em um nível aumentado de produtos protéicos que favoreceram a proliferação de células cancerosas. Um exemplo é a amplificação do gene *erbB2/neu/HER2* e a expressão elevada da proteína codificada por ele. Essa amplificação em particular, quando detectada em cânceres de mama, foi correlacionada com a diminuição da sobrevida dos pacientes, sugerindo que ela tem um papel causal no direcionamento do crescimento destes tumores.

- Enquanto um mecanismo importante de ativação para os genes associados a retrovírus estava aparente (desregulação pela colocação da sua expressão sob o controle de promotores transcricionais virais), o(s) mecanismo(s) pelos quais os proto-oncogenes humanos normais foram convertidos em oncogenes na ausência de vírus não estava evidente.
- O seqüenciamento de um oncogene *H-ras* transfectado revelou que ele era diferente do seu proto-oncogene correspondente em uma única base que estava localizada na fase de leitura do gene. Isso resultou em uma substituição de aminoácido no produto, gerando uma proteína com comportamento aberrante.
- A descoberta da mutação pontual em *H-ras* estabeleceu um novo mecanismo para ativação de oncogene baseada em uma mudança na estrutura de uma proteína codificada pelo oncogene.
- Ambos os mecanismos de ativação – regulador e estrutural – poderiam colaborar para criar um oncogene ativo.
- Observou-se que o oncogene *myc* surgiu por vários mecanismos diferentes: integração de pró-vírus, amplificação gênica e translocação cromossomal.
- A amplificação gênica ocorre pela replicação preferencial de um segmento (o amplicon) de DNA cromossomal. O resultado poderia ser disposições lineares repetidas ao longo do segmento, que aparecem como regiões homogeneamente coradas (HSRs) de um cromossomo quando visualizadas sob o microscópio óptico. Alternativamente, a região que carrega o segmento amplificado poderá se desligar do cromossomo e poderá ser visualizada como pequenas partículas extracromossomais (minutos duplos) de replicação independente. A amplificação gênica nem sempre resulta na superexpressão do gene.
- A translocação envolve a fusão de uma região de um cromossomo a um cromossomo não-homólogo. A translocação pode colocar um gene sob o controle de um promotor transcricional estranho e levar à sua superexpressão, como é o caso com os oncogenes *myc* nos linfomas de Burkitt. Nestes tumores, as seqüências promotoras da transcrição de qualquer um dos três diferentes genes de imunoglobulinas são recolocadas próximas à secção do Cromossomo 8 que carrega o proto-oncogene *myc*. Pela separação do gene *myc* do seu promotor de transcrição normal e a sua colocação sob o controle de um regulador altamente ativo, essa translocação resulta na superexpressão de *myc*.
- Uma variedade de mudanças estruturais nas proteínas pode também levar a ativação do oncogene. Exemplos incluem alterações na estrutura dos receptores de fatores de crescimento (tais como receptores EGF) e translocações que fusionam duas fases de leitura distintas para gerar uma proteína híbrida (como Bcr-Abl). Ambos os tipos de alterações desregulam as proteínas, levando-as a emitirem sinais promotores de crescimento de uma maneira forte e persistente.

Questões elaboradas

1. Qual evidência sugere que os genomas de retrovírus endógenos não são responsáveis por uma parte dos cânceres humanos?
2. Por que um ensaio como o de transfecção focal falha na detecção de certos tipos de oncogenes humanos associados a tumores?
3. Qual mecanismo poderia fazer com que uma certa região do DNA cromossomal sofresse uma amplificação acidental?
4. Quantos mecanismos moleculares distintos poderiam ser responsáveis por converter um proto-oncogene em um oncogene potente?
5. Quantos mecanismos moleculares distintos poderiam permitir translocações cromossomais para produzir proto-oncogenes ativos em oncogenes?
6. Quais estratégias experimentais de pesquisa você proporia se quisesse começar uma varredura sistemática em um genoma de vertebrado com o objetivo de enumerar todos os proto-oncogenes que ele abriga?
7. Uma vez que os proto-oncogenes representam responsabilidades distintas para um organismo, no qual podem estimular câncer, por que eles não foram eliminados dos genomas dos cordados?

Leitura adicional

- Alitalo K and Schwab M (1986) Oncogene amplification in tumor cells. *Adv. Cancer Res.* 47, 235–281.
- Barbacid M (1987) *ras* genes. *Annu. Rev. Biochem.* 56, 779–827.
- Bishop JM (1991) Molecular themes in oncogenesis. *Cell* 64, 235–248.
- Bos JL (1989) *Ras* oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res.* 49, 4682–4689.
- Brodeur G (2003) Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nat. Rev. Cancer* 3, 203–216.
- Butel J. (2000) Viral carcinogenesis: revelation of molecular mechanisms and etiology of human disease. *Carcinogenesis* 21, 405–426.
- Cleary ML (1991) Oncogenic conversion of transcription factors by chromosomal translocations. *Cell* 66, 619–622.
- Cooper GM (1995) *Oncogenes*, 2nd ed. Boston and London: Jones and Bartlett.
- Lowy DR & Willumsen BM (1993) Function and regulation of *ras*. *Annu. Rev. Biochem.* 62, 851–891.
- Martin GS (2001) The hunting of the Src. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 467–475.
- Mitelman F, Johansson B & Mertens F (eds) (2004) Mitelman Database of Chromosome Aberrations in Cancer. <http://cgap.nci.nih.gov/Chromosomes/Mitelman>
- Rabbitts TH (1991) Translocations, master genes, and differences between the origins of acute and chronic leukemias. *Cell* 67, 641–644.
- Reddy EP, Skalka AM & Curran T (eds) (1988) *The Oncogene Handbook*. Amsterdam: Elsevier.
- Rosenberg N & Jolicoeur P (1997) Retroviral pathogenesis. In *Retroviruses* (JM Coffin, SH Hughes, HE Varmus eds), pp 475–585. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Rowley JD (2001) Chromosome translocations: dangerous liaisons revisited. *Nat. Rev. Cancer* 1, 245–250.
- Solomon E, Borrow J & Goddard AD (1991) Chromosome aberrations and cancer. *Science* 254, 1153–1160.



CAPÍTULO 5

Fatores de Crescimento, Receptores e Câncer

“A capacidade de alguns soros fetais bovinos de estimular o crescimento celular, e o diminuído requerimento de células transformadas por esses fatores, pode se dever ao fato de que eles são idênticos ou similares aos sintetizados por algumas células embrionárias ou neoplásicas.”

David E. Comings, geneticista, 1973.

A descoberta dos oncogenes e de seus precursores, os proto-oncogenes, trouxe à tona muitas questões. Dentre elas, destaca-se a dúvida de como os oncogenes, agindo por meio de seus produtos, as proteínas, obtiveram sucesso perturbando tão profundamente o comportamento celular. Diversos fenótipos celulares foram alterados concomitantemente pela ação de oncoproteínas como a Src e a Ras, os produtos dos genes *src* e *ras*, respectivamente. Como uma única espécie protéica poderia obter sucesso modificando tantas vias regulatórias diferentes ao mesmo tempo?

Pistas importantes sobre o funcionamento das oncoproteínas vieram do estudo detalhado de como células normais regulam seu crescimento e divisão. Células normais recebem de seus arredores sinais estimulatórios de crescimento. Esses sinais são processados e integrados por circuitos complexos dentro da célula, que decide se crescimento celular e divisão são ou não apropriados (Figura 5.1)

Essa necessidade de receber sinais extracelulares na superfície celular e transferi-los para o citoplasma cria um problema biológico desafiador. Os espaços intra e extracelulares são separados por uma bicamada lipídica, ou seja, a membrana plasmática. Essa membrana é uma barreira que bloqueia efetivamente o movimento de virtualmente todas as moléculas, excetuando-se as muito pequenas, o que resulta em concentrações muito diferentes da maioria das moléculas (incluindo íons) em cada um dos lados. Como as células foram capazes de resolver o problema da passagem (**transdução**) de sinais através de uma membrana praticamente

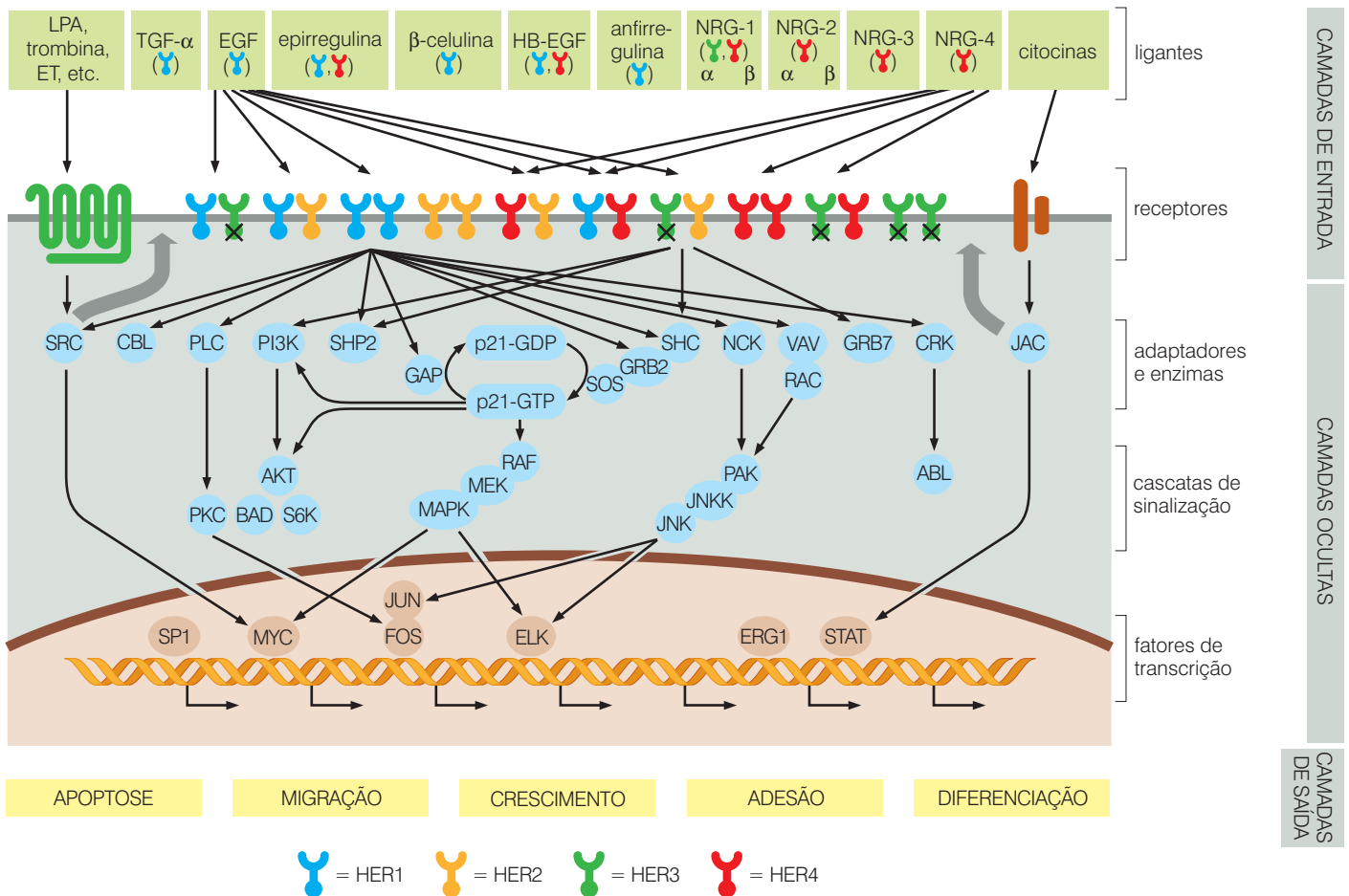


Figura 5.1 A rede de sinalização ErbB: como as células se comunicam com seus arredores. Este desenho é uma representação de como as células se comunicam com seus arredores – o tópico de grande parte deste capítulo. Conforme indicado aqui, diversas moléculas mensageiras (ligantes, *quadrados verdes, acima*) interagem com um arranjo complexo de receptores da superfície celular, que realizam a transdução de sinais da membrana plasmática (*cinza, no topo*) para o citoplasma, onde uma rede complexa de proteínas transdutoras os processa. Alguns atingem o núcleo da célula (*abaixo*), podendo ocasionar uma série de respostas biológicas (“camada de saída”, *retângulos amarelos, abaixo*). Muitos dos componentes desse circuito, tanto na superfície quanto no interior da célula, estão envolvidos na patogênese do câncer. Essa figura focaliza alguns dos receptores que estão presentes na superfície das células de mamíferos – o tópico principal deste capítulo. As cascatas de sinalizadores e adaptadores serão discutidas no próximo capítulo. (De Y. Yarden e M. X. Slivkowski, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2:127-137, 2001.)

impermeável? E, dada essa barreira, como o interior da célula pode ser capaz de saber o que está acontecendo no espaço extracelular circundante?

Esses processos de sinalização são parte de um dilema maior na comunicação célula-célula. Eles precisaram ser solucionados quando os primeiros animais multicelulares (metazoários) surgiram, de 600 a 700 milhões de anos atrás. Sem uma forma efetiva de comunicação intercelular, o comportamento de células individuais não poderia ser coordenado, e a formação de tecidos de arquitetura complexa e organismos seria inconcebível. Obviamente tal comunicação dependia da capacidade de algumas células de emitir sinais e de outras células de receberem e reagirem de forma específica a tais sinais.

Na maior parte, os sinais transmitidos entre células são carregados por proteínas. Assim, a emissão de sinais requer a capacidade de algumas células de liberar proteínas para o espaço extracelular. Tal liberação – o processo de secreção protéica – também é complicada pela impermeabilidade da membrana plasmática. Após a liberação das proteínas sinalizadoras no espaço extracelular, as células receptoras devem ser capazes de sentir a presença dessas proteínas nos seus arredores. Grande parte deste capítulo está focada nesse segundo problema – a forma como células normais recebem sinais do ambiente que as circunda. Como veremos, a regulação ineficaz de tais sinais tem papel central na formação de células cancerígenas.

5.1 Células normais de metazoários controlam a vida umas das outras

Como comentado anteriormente (Seção 4.6), as versões normais de proteínas codificadas por oncogenes com frequência atuam como componentes da maquinaria que permite que as

células recebam e processem sinais bioquímicos reguladores da proliferação celular. Assim, para que realmente apreciemos a complexidade das funções dos oncogenes e oncoproteínas, precisamos entender em detalhe a forma como a proliferação de células normais é governada.

Para principiar essa discussão, nos valeremos de um princípio básico e conhecido. A arquitetura apropriada dos tecidos depende totalmente da manutenção de proporções adequadas de diferentes constituintes de tipos celulares em um tecido, substituindo células que estejam faltando ou descartando células excedentes ou desnecessárias (Figura 5.2). Ferimentos devem ser reparados e ataques de agentes infecciosos externos devem ser evitados por meio de ações concertadas das várias células do tecido.

Todas essas funções dependem da cooperação entre grandes grupos de células. Isso explica porque células em um tecido vivo estão constantemente trocando informações umas com as outras. Muito dessa troca é mediado por **fatores de crescimento (GFs)**. Os GFs são pequenas proteínas liberadas por algumas células que transitam pelo espaço intercelular carregando consigo mensagens biológicas específicas e, eventualmente, influenciando outras células. Eles transportam muitos dos sinais que congregam as células de um mesmo tecido em uma única comunidade, na qual todos os membros estão em comunicação contínua com seus vizinhos.

Decisões sobre crescimento ou não-crescimento devem ser realizadas visando ao bem-estar do tecido como um todo e do organismo em si, não para o benefício de seus componentes celulares individuais. Por essa razão, nem uma única célula no verdadeiro condomínio de células que é um tecido vivo pode possuir a autonomia para decidir se irá proliferar ou permanecer em um estado quiescente, ou seja, sem proliferar. Essa decisão complexa deve ser tomada apenas após consultar outras células do tecido. As células vizinhas podem prover uma determinada célula com os fatores de crescimento que estimulam sua proliferação ou com fatores inibitórios de crescimento, que o desencorajem.

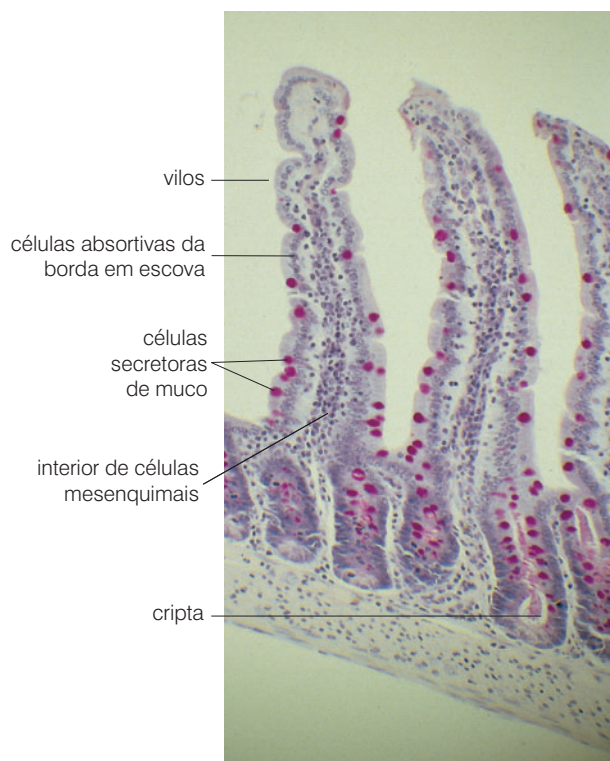


Figura 5.2 Manutenção da arquitetura tecidual A fileira de células epiteliais do intestino delgado mostrada aqui ilustra um grande número de tipos celulares distintos que coexistem em um tecido para conferir estrutura e função tecidual normais. O número relativo e a posição de cada tipo celular devem ser rigidamente controlados. Esse controle é atingido em grande parte pela troca de sinais entre células vizinhas do tecido. Neste epitélio em particular, a sinalização célula-célula também assegura que novas células epiteliais – os chamados enterócitos, no intestino – sejam continuamente geradas nas criptas (nas bases das vilosidades com aparência de dedos), para substituir outras células que migraram para porções apicais das vilosidades, onde são descartadas. Dentre muitas outras células epiteliais, estão as células secretoras de muco (*vermelho-escuro*) e as células absorptivas, bem como as células enteroendócrinas e as células de Paneth (*não-mostradas*). Junto a isso, no meio de cada vilosidade, há um interior de células mesenquimais, que juntas constituem o estroma e incluem fibroblastos, células endoteliais, pericitos e macrófagos. As proporções adequadas de cada tipo celular distinto devem ser mantidas para assegurar estrutura e função tecidual apropriada. (de B. Alberts et al., *Molecular Biology of the Cell*, 4th ed. New York: Garland Science, 2002.)

Por fim, todas as decisões tomadas por uma célula individual a respeito de sua proliferação devem, por necessidade, representar um consenso compartilhado com as células que residem na sua vizinhança.

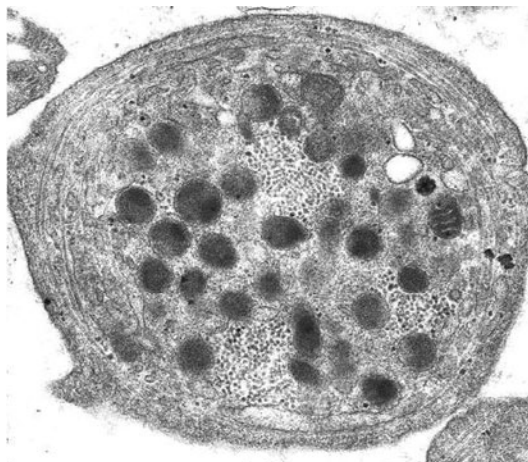
A dependência de células individuais na sua vizinhança é claramente ilustrada pelo comportamento de células normais quando são removidas do tecido vivo e propagadas em uma placa de Petri. Ainda que o meio líquido colocado sob as células contenha todos os nutrientes necessários para sustentar seu crescimento e divisão, incluindo aminoácidos, vitaminas, glicose e sais, esse meio por si só não é suficiente para induzir essas células a proliferarem. Pelo contrário, essa decisão depende da adição de soro ao meio, normalmente preparado a partir do sangue de alguns bezerros ou fetos bovinos. Esse soro contém os fatores de crescimento que fazem com que as células se multipliquem.

Quando ocorre a coagulação sanguínea, forma-se o soro. As plaquetas sanguíneas aderem umas às outras formando uma matriz que se contrai gradualmente e capta a maioria dos componentes celulares do sangue, incluindo células brancas e vermelhas. Em um tecido danificado, a formação de coágulos é necessária para conter o sangramento. O fluido celular que permanece após a formação e retração de coágulos constitui o soro.

Enquanto as plaquetas em um local de ferimento estão em processo de agregação como parte da formação de um coágulo, elas também iniciam um processo de cura, por meio da liberação de fatores de crescimento, em especial o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), no meio circundante (Figura 5.3). O PDGF é um potente estimulador de fibroblastos, os quais formam grande parte do tecido conjuntivo, incluindo as camadas celulares abaixo dos epitélios (veja a Figura 2.3). Fatores estimuladores de crescimento, como o PDGF, são freqüentemente chamados de **mitógenos**, para indicar sua capacidade de induzir proliferação celular. Mais especificamente, PDGF atrai os fibroblastos até o local da injúria celular e então estimula a sua proliferação (veja a Figura 5.4A). (Outros fatores de crescimento, como o fator de crescimento epidermal [EGF], podem causar alterações dramáticas também na forma das células [Figura 5.4B].) Sem a estimulação pelo PDGF derivado do soro, fibroblastos em cultura permanecerão viáveis e ativos metabolicamente por semanas em uma placa de Petri, mas ainda assim não se dividirão ou crescerão.

Essa dependência dos fibroblastos de sinais estimulatórios de crescimento liberados por um segundo tipo celular (no caso, de plaquetas do sangue), reflete centenas de rotas similares de comunicação célula-célula, que operam em tecidos vivos para encorajar ou desencorajar a proliferação celular. Além disso, conforme discutido anteriormente, PDGF e EGF são apenas dois exemplos de um grupo considerável de fatores de crescimento, que auxiliam a passagem de importantes mensagens controladoras do crescimento de célula para célula.

Figura 5.3 Armazenamento de PDGF pelas plaquetas As plaquetas possuem uma grande quantidade de vesículas secretoras (*exocíticas*) chamadas grânulos (*pontos escuros grandes*), que contêm elevado número de moléculas sinalizadoras importantes, destacando-se, entre estas, o PDGF. Quando as plaquetas são ativadas durante a formação de um coágulo, essas vesículas fusionam-se à membrana plasmática, liberando mitógenos previamente armazenados e fatores de sobrevivência no espaço extracelular. (Cortesia de S. Israels.)



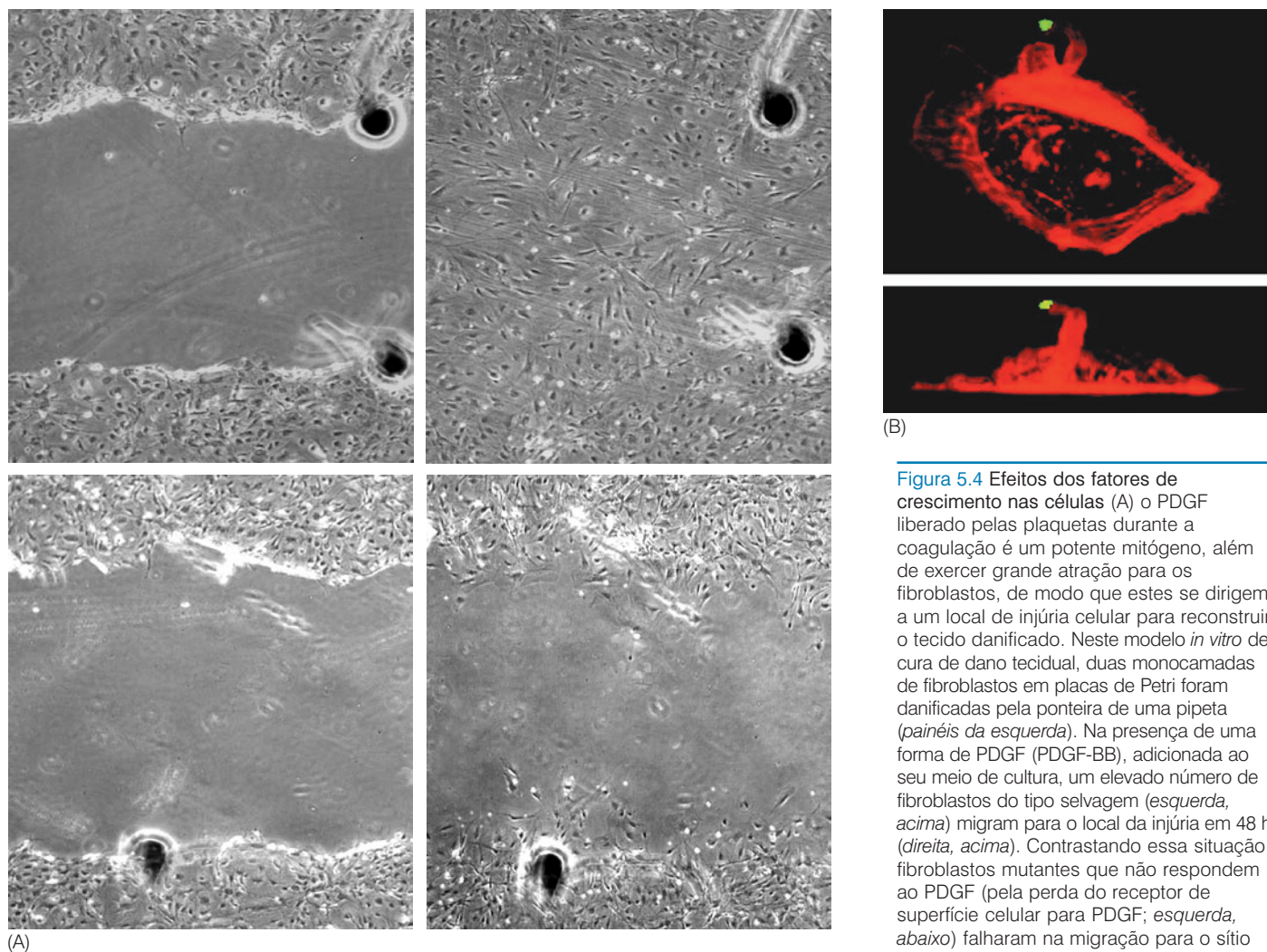


Figura 5.4 Efeitos dos fatores de crescimento nas células (A) o PDGF liberado pelas plaquetas durante a coagulação é um potente mitógeno, além de exercer grande atração para os fibroblastos, de modo que estes se dirigem a um local de injúria celular para reconstruir o tecido danificado. Neste modelo *in vitro* de cura de dano tecidual, duas monocamadas de fibroblastos em placas de Petri foram danificadas pela ponteira de uma pipeta (*painéis da esquerda*). Na presença de uma forma de PDGF (PDGF-BB), adicionada ao seu meio de cultura, um elevado número de fibroblastos do tipo selvagem (*esquerda, acima*) migram para o local da injúria em 48 h (*direita, acima*). Contrastando essa situação, fibroblastos mutantes que não respondem ao PDGF (pela perda do receptor de superfície celular para PDGF; *esquerda, abaixo*) falharam na migração para o sítio do dano tecidual após o mesmo intervalo de tempo (*direita, abaixo*). (B) Cinco minutos após a aplicação de EGF (*ponto verde*), previamente imobilizado em uma esfera, em uma célula de carcinoma mamário. A célula reorganizou seu citoesqueleto de actina (*vermelho*) e estendeu um apêndice de citoplasma em direção ao fator de crescimento (*acima, visão superior; abaixo, visão lateral*). (A, de Z. Gao et al., *J. Biol. Chem.* 280:9375-9389, 2005; B, de S.J. Kempik et al., *J. Cell Biol.* 162:781-787, 2003.)

Conforme será desenvolvido ao longo deste capítulo, moléculas sinalizadoras que permitem que as células sintam a presença de fatores de crescimento em suas redondezas, carreguem a informação que estes transmitem para o interior da célula e processem essa informação são usurpadas por proteínas codificadas por oncogenes. Tomando conta da maquinaria natural de estimulação de crescimento da célula, as oncoproteínas são capazes de iludir a célula, de forma que ela acredite que encontrou fatores de crescimento ao seu redor. Uma vez que essa ilusão tenha ocorrido, a célula responde cegamente por meio da proliferação, da maneira como ela faria se fatores de crescimento em abundância estivessem realmente presentes no meio circundante.

5.2 A proteína Src funciona como tirosina cinase

As primeiras pistas de como a sinalização celular utiliza fatores de crescimento veio da análise bioquímica do oncogene *v-src* e da proteína que ele especifica. O caminho de pistas levou, passo a passo, dessa proteína aos receptores utilizados pelas células para detectar fatores de crescimento e também às vias de sinalização intracelular que controlam a proliferação de células normais e de células malignas.

A caracterização inicial das oncoproteínas codificadas pelo gene *v-src* foi de grande interesse, já que foi a primeira oncoproteína a ser estudada, propiciando aos que pesquisavam sobre câncer uma visão inicial dos mecanismos bioquímicos da transformação celular.

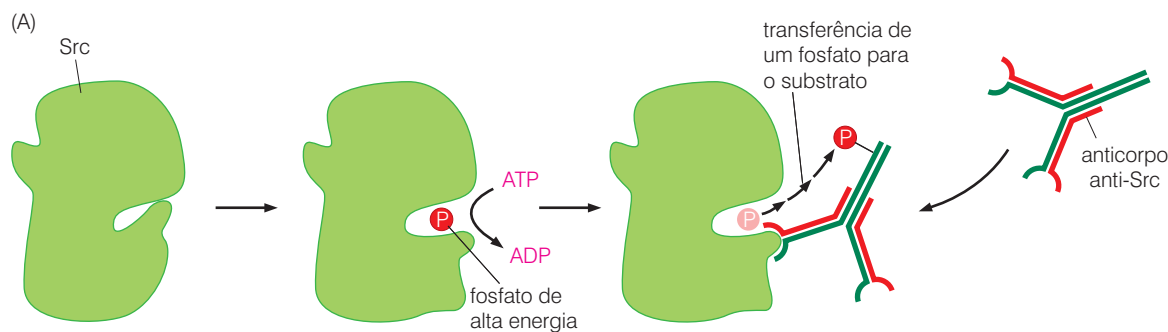
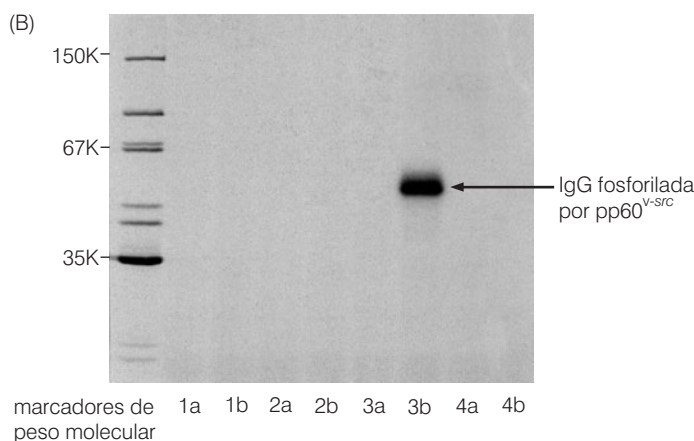


Figura 5.5 Fosforilação de uma molécula precipitada de anticorpo por Src. Proteínas cinases atuam removendo o fosfato γ de alta energia do ATP e ligando esse fosfato a grupos hidroxila nas cadeias laterais de resíduos de aminoácidos de serina, treonina ou tirosina, de proteínas-substrato. (A) A molécula de anticorpo que foi utilizada para imunoprecipitar moléculas de Src (veja a Barra lateral 5.1) também serve como substrato para fosforilação por essa cinase. A sua fosforilação é indicada pela presença de um grupamento fosfato ligado (vermelho). (B) Este experimento revelou, pela primeira vez, a atividade bioquímica associada a uma oncoproteína. Soro normal de coelho (canaletas 1a, 2a, 3a, 4a) e soro de um coelho possuidor de um tumor induzido por RSV (canaletas 1b, 2b, 3b, 4b) foram utilizados para imunoprecipitar lisados celulares que foram incubados com ATP marcado com ^{32}P . Os lisados foram preparados a partir de fibroblastos de embriões de galinha não-infectados (CEFs, canaletas 1a, b), CEFs infectados com o vírus da leucose aviária (ALV) (canaletas 2a, b), CEFs infectados com SRV tipo selvagem (wt) (canaletas 3a, b) e CEFs infectados com um mutante defeutivo de RSV (canaletas 4a, b). Apenas a combinação de soro de lebre possuidor de tumor e infecção por RSV wt originou uma proteína fortemente marcada com ^{32}P que co-migrou com o anticorpo precipitado, indicando que a molécula de anticorpo foi fosforilada pela oncoproteína Src (cujo peso molecular não aparece nessa análise). (B, de M. S. Collett e R. L. Erikson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75:2021-2024, 1978.)



Após a clonagem molecular da oncoproteína codificada por *v-src*, a sequência de aminoácidos de seu produto protéico foi diretamente deduzida a partir da sequência de nucleotídeos do gene clonado. A proteína codificada constitui-se de uma cadeia polipeptídica de 533 resíduos de aminoácidos, possuindo uma massa molecular de 60 quilodaltons (kDa).

A sequência de aminoácidos de Src forneceu informações a respeito de como essa oncoproteína promove proliferação celular e transformação. Células de mamíferos e aves, transformadas com o gene *v-src*, eram conhecidas por exibir uma forma radicalmente alterada, bombear glicose para o meio extracelular mais rapidamente do que células normais, crescer sem aderir a uma superfície, perder inibição por contato e formar tumores. Quaisquer que fossem os mecanismos precisos de ação, era óbvio que Src afetava, direta ou indiretamente, uma vasta gama de alvos celulares.

Pesquisas bioquímicas conduzidas de forma astuta, em 1977 e 1978, solucionaram o “quebra-cabeça” do modo de operação de Src. Foram produzidos anticorpos que especificamente reconheciam e ligavam-se à Src (Barra lateral 5.1). As moléculas de anticorpos tornavam-se fosforiladas quando incubadas em uma solução com a proteína Src e trifosfato de adenosina (ATP), o doador universal de fosfato na célula. A fosforilação já era conhecida por envolver a ligação covalente de grupamentos fosfato às cadeias laterais de resíduos específicos de aminoácidos. Assim, ficou claro que a Src operava como uma proteína **cinase** – uma enzima que remove um grupo fosfato de alta energia do ATP e o transfere para um substrato protéico adequado – no caso, uma molécula de anticorpo (Figura 5.5). Como Src normalmente não fosforila moléculas de anticorpos, a sua capacidade de fazê-lo, nesses experimentos preliminares, sugeriu que o seu modo de ação usual envolveria a fosforilação de certas proteínas-alvo dentro da célula.

Independentemente de sua atividade de cinase, Src era também uma **fosfoproteína**, ou seja, ela carregava grupamentos fosfato ligados covalentemente a uma ou mais de suas cadeias laterais de aminoácidos. Isso indicou que Src atuava como substrato de fosforilação por uma proteína cinase – ou fosforilando a si mesma (**autofosforilação**), ou servindo como substrato para ainda outra

Barra lateral 5.1 Produzir anticorpos anti-Src representou um grande desafio A análise ampla de centenas de proteínas celulares dependeu da capacidade de detectar e analisar especificamente a proteína de interesse (como Src), em meio à “sopa” complexa de proteínas presente nas células. Essa detecção freqüentemente dependeu do uso de anticorpos que especificamente reconhecem e ligam proteínas como Src, ignorando todas as outras proteínas celulares a seu redor. A produção de tais anticorpos envolve a injeção de uma proteína intacta (p. ex., a proteína Src inteira) ou um **oligopeptídeo** sintético (p. ex., uma pequena proteína cuja sequência de aminoácidos reflete a sequência de um pequeno segmento da proteína Src) em um animal, em geral camundongo, lebre ou bode. A esperança é que o material injetado seja **imunogênico** (capaz de desencadear uma resposta imune) no animal, fazendo com que ele produza anticorpos que especificamente liguem e precipitem essa proteína em um **lisado celular** (preparação de células rompidas).

O sistema imune dos mamíferos freqüentemente reage com vigor a um **antígeno** externo, isto é, uma proteína que possua sequências peptídicas que são desconhecidas e novas para o sistema imune. Por outro lado, o sistema imune habitualmente não possui resposta imune alguma (dessa forma, não produzindo anticorpos) contra uma proteína injetada que seja próxima a alguma das proteínas normalmente presentes no animal. Essa ausência de imunoreatividade contra proteínas familiares é chamada **tolerância** imunológica, um fenômeno ao qual retornaremos no Capítulo 15.

Aqueles que produziram pela primeira vez anticorpos anti-Src, utilizaram uma cepa de RSV que infectava e transformava células de mamíferos, induzindo tumores em mamíferos. Eles anteciparam que os tumores resultantes expressariam a proteína Src de galinha, além de que células tumorais que estivessem morrendo exporiam essa proteína ao sistema imune do hospedeiro possuidor do tumor, provocando uma resposta imune. Na verdade, a proteína Src mostrou-se fracamente imunogênica na maioria dos animais. O motivo para isso foi descoberto muito tempo depois: a estrutura da proteína Src é muito conservada evolutivamente. De acordo com isso, a proteína Src de galinha é quase idêntica à proteína correspondente da maioria das espécies de mamíferos, não sendo, portanto, reconhecida facilmente como uma proteína estranha pelo sistema imune destes. Ao final, essas investigações obtiveram sucesso (por razões desconhecidas) na produção de anti-soro anti-Src apenas em lebres que possuíam tumores induzidos por RSV. Os fatores que determinam a imunogenicidade de uma proteína como Src em uma ou em outra espécie são complexos e freqüentemente obscuros. Uma vez disponível, o anti-soro anti-Src pode ser usado para precipitar (ou **imunoprecipitar**) a proteína Src de lisados de uma grande va-

riedade de células transformadas por RSV, e também de células normais, não-transformadas (Figura 5.6). A proteína Src foi detectada como um polipeptídeo migrando como uma proteína de 60 kDa, nas canaletas 8 e 9 da Figura 5.6.

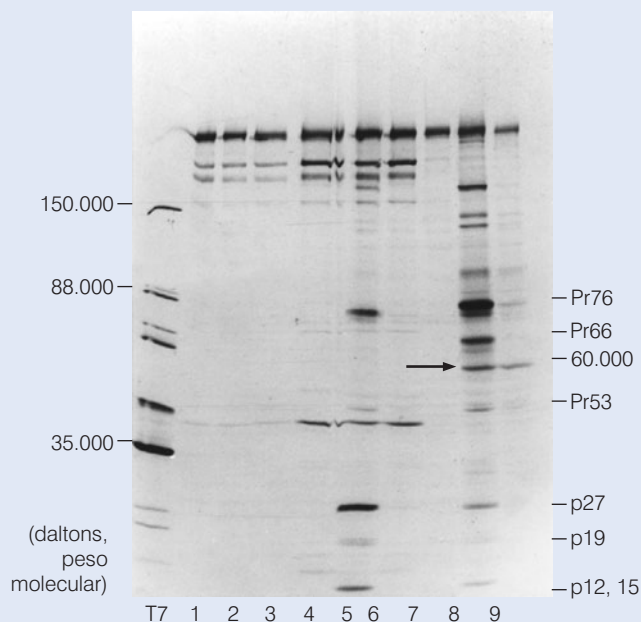


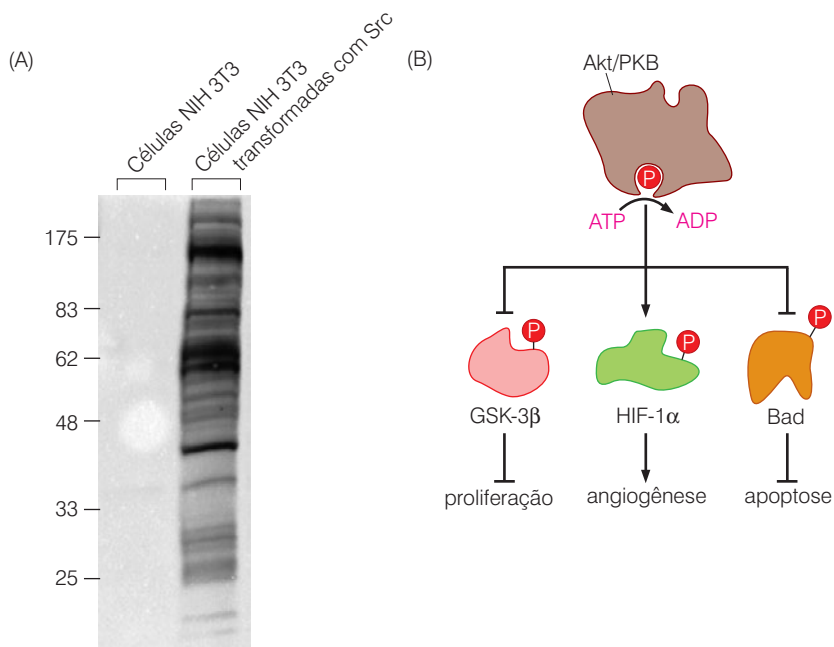
Figura 5.6 Imunoprecipitação da proteína Src Quando a proteína Src foi primeiramente analisada, as únicas formas de estudá-la dependiam de *imunoprecipitar* essa proteína da mistura de milhares de outras proteínas celulares. Nesse caso, diversas tentativas de produzir um anti-soro anti-Src finalmente resultaram em uma preparação de anticorpos que pôde ser usada para imunoprecipitar essa proteína nas células. Marcadores de peso molecular (em daltons) estão na canaleta mais à esquerda (T7); canaletas 1-3: lisado de células normais, não-infectadas; canaletas 4-6: lisado de células infectadas com RSV mutante com o gene *src* deletado; canaletas 7-9: lisado de células infectadas com RSV tipo selvagem. Canaleta 7: soro de lebre normal; canaleta 8: soro de lebre possuidora de tumor; canaleta 9: o mesmo da canaleta 8, exceto que a amostra foi pré-incubada com lisado de partículas de RSV. A banda de 60 kDa nas canaletas 8 e 9 (*seta*) representou a primeira detecção da oncoproteína RSV. (p12, p15, p19, p27, Pr53, Pr66 e Pr76 são proteínas do virion de RSV.) (De A. F. Purchio et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 1567-1571, 1978.)

cinase. Seu peso molecular e *status* de fosfoproteína fizeram com que ela fosse inicialmente chamada de pp60^{src}, ainda que daqui por diante nos refiramos a ela simplesmente como Src.

O fato de que Src atua como uma cinase foi uma grande revelação. A princípio, uma proteína cinase pode fosforilar múltiplos substratos protéicos distintos dentro da célula. (No caso de Src, mais de 50 substratos diferentes já foram enumerados.) Uma vez fosforilado, cada um desses substratos protéicos pode ser funcionalmente alterado e continuar, por sua vez, alterando as funções de seu próprio grupo de alvos, abaixo na cascata de sinalização. Essa forma de ação (Figura 5.7) pareceu explicar como uma proteína como Src poderia agir pleiotropicamente para perturbar múltiplos fenótipos celulares. Nessa época, outras proteínas cinases já haviam sido descobertas como capazes de regular circuitos complexos, principalmente aquelas envolvidas no metabolismo de carboidratos.

Figura 5.7 Ações das proteínas cinases (A)

Esta auto-radiografia de proteínas separadas por eletroforese em gel ilustra o fato de que o estado de fosforilação de proteínas distintas dentro da célula pode ser alterado pela ação da Src cinase expressa nas células pelo vírus do sarcoma de Rous. A canaleta da esquerda mostra o arranjo de proteínas fosforiladas nos fibroblastos NIH 3T3 não-transformados de camundongo; a canaleta da direita mostra as proteínas fosforiladas em células expressando uma Src cinase ativa. Marcadores de peso molecular, em kDa, são mostrados à esquerda. De fato, essa análise detecta especificamente as espécies proteicas que carregam resíduos de fosfotirosina, o produto conhecido da ação da Src cinase (veja a Figura 5.8). A canaleta da esquerda na figura está essencialmente em branco, indicando a ausência relativa de proteínas contendo fosfotirosina nas células que não expressam Src. (B) Ações pleiotrópicas de uma proteína cinase geralmente derivam da sua capacidade de fosforilar, e, portanto, modificar, o estado funcional de um número distinto de substratos protéicos. Estão ilustradas as ações da Akt/PKB cinase, que é uma serina/treonina cinase e pode influenciar uma vasta gama de processos biológicos por meio da fosforilação de proteínas essenciais de controle. Assim, Akt/PKB pode inativar as ações antiproliferativas de GSK-3 β e a capacidade pró-apoptótica de Bad, e pode ativar o poder angiogênico (de indução de vasos sanguíneos) de HIF-1 α . (A, de S. M. Ulrich et al., *Biochemistry* 42:7915-7921, 2003.)



A proteína Src foi logo descoberta como bastante diferente de todas as outras proteínas cinases conhecidas até então. Estas outras cinases eram conhecidas por ligar grupamentos fosfato às cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos de serina e treonina. Src, por outro lado, fosforila certos resíduos de tirosina de seus substratos protéicos (Figura 5.8). Uma quantificação cuidadosa dos resíduos de aminoácidos fosforilados na célula revelou o quão pouco usual essa atividade enzimática é. Mais de 99% dos fosfoaminoácidos em células normais são fosfotreonina e fosfoserina; a fosfotirosina constitui apenas 0,05 a 0,1% do total de fosfoaminoácidos dessas células.

Após a transformação de células com o oncogene *v-src*, o nível de fosfotirosina aumenta dramaticamente, tornando-se até 1% do total de fosfoaminoácidos dessas células. (Isso ajuda a explicar as diferenças marcantes entre as duas canaletas na Figura 5.7A). Quando as mesmas células foram transformadas por outros oncogenes, como *H-ras*, seu conteúdo de fosfoaminoácidos variou muito pouco. Assim, a criação de resíduos de fosfotirosina é um atributo específico de Src e não está associado a todos os mecanismos de transformação celular. Estudos subsequentes obtiveram uma segunda conclusão: a sinalização por meio da fosforilação de tirosina é uma abordagem grandemente utilizada por vias de sinalização mitogênicas de mamíferos, ao passo que as cinases envolvidas em milhares de outros processos de sinalização contam quase que exclusivamente com a fosforilação de serina e treonina para trocar suas mensagens.

Formas mutantes de Src que perderam a capacidade de fosforilar proteínas-substrato também perdem seus poderes transformantes. Assim, a evidência acumulada convergiu para a idéia de que Src é capaz de transformar células devido a sua capacidade de agir como tirosina cinase (TK) e fosforilar um grupo ainda não caracterizado de proteínas-substrato nessas células. Ainda que uma pista inicial importante, esses avanços apenas permitiram a reformulação de questões maiores acerca dessa área de pesquisa. Agora o problema pode ser colocado da seguinte forma: como a fosforilação de resíduos de tirosina resulta em transformação celular?

5.3 O receptor EGF funciona como tirosina cinase

Após a clonagem e seqüenciamento do oncogene *v-src*, os oncogenes de outros retrovírus com atividade agudamente transformadora foram isolados por clonagem molecular e submetidos ao seqüenciamento de DNA. Infelizmente, na grande maioria dos casos, a

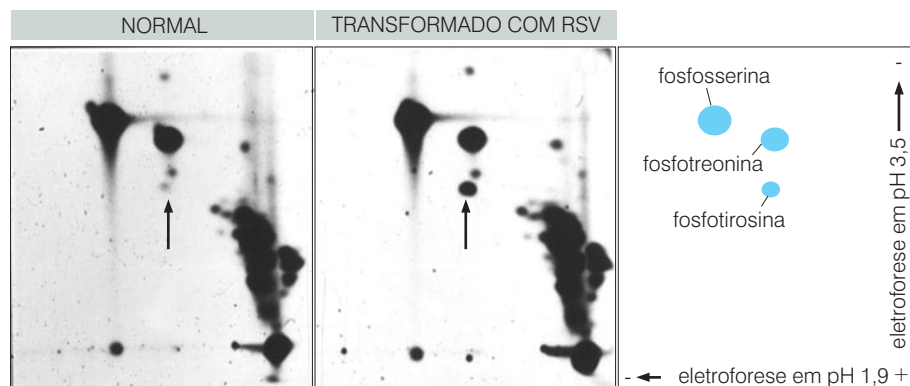


Figura 5.8 Especificidade de substrato da Src cinase A eletroforese pode ser utilizada para diferenciar os três tipos de fosfoaminoácidos – fosfotirosina, fosfotreonina e fosfoserina. Nas imagens mostradas aqui, a eletroforese foi realizada em direção ao cátodo em pH 1,9 (*direita para esquerda*), e em direção ao cátodo em pH 3,5 (*de baixo para cima*). O painel à direita mostra a localização esperada de cada um dos três fosfoaminoácidos após a eletroforese. Em fibroblastos de embriões normais de galinha (CEFs; *painel da esquerda*), fosfoserina e fosfotreonina estão presentes em abundância, ao passo que quase nenhum resíduo de fosfotirosina é evidente (*seta*). No entanto, em CEFs transformados com *src* (*painel central*), o nível de fosfotirosina eleva-se dramaticamente. Compostos fosforilados não relacionados e fosfato inorgânico podem ser vistos bem abaixo, à direita, de cada uma das eletroforeses. (Cortesia de T. Hunter.)

seqüência de aminoácidos dos seus produtos protéicos originou poucas pistas sobre sua função protéica. As próximas grandes descobertas, no entanto, vieram de outra área de pesquisa. Biologistas celulares interessados em como as células trocam sinais umas com as outras isolaram diversas proteínas envolvidas em sinalização célula-célula e determinaram a seqüência de aminoácidos dessas proteínas. Inesperadamente, conexões bastante próximas foram descobertas entre essas proteínas de sinalização e os produtos protéicos de certos oncogenes.

Essa linha de pesquisa teve início com o EGF, o primeiro dos fatores de crescimento a ser descoberto. O EGF foi inicialmente caracterizado devido a sua capacidade de provocar a abertura prematura dos olhos em camundongos recém-nascidos. Logo depois, EGF foi implicado em efeitos mitogênicos quando aplicado a diversos tipos celulares epiteliais.

O EGF se liga à superfície das células cujo crescimento ele estimula; outras células às quais o EGF não foi capaz de se ligar foram irresponsivas a seus efeitos mitogênicos. Juntas, essas observações sugeriram o envolvimento de uma proteína de superfície celular, um receptor de EGF (EGF-R), que era capaz de reconhecer especificamente EGF no espaço extracelular, ligar-se a ele e informar ao interior celular que um encontro com EGF ocorreu. Na linguagem da bioquímica, o EGF serve como um ligante para o seu receptor cognato – o ainda hipotético receptor de EGF (EGF-R).

O isolamento da proteína EGF-R mostrou-se desafiador, já que esse receptor, como muitos outros, é normalmente expresso em níveis muito baixos na célula. Os pesquisadores contornaram esse problema utilizando uma linhagem celular tumoral (um carcinoma epidermal de útero) que expressa EGF-R em níveis elevados – até 100 vezes maior do que o normal. Dessas células, uma grande quantidade de proteína receptora foi obtida. Ela pôde então ser purificada e submetida à análise da seqüência de aminoácidos.

A seqüência da proteína EGF-R proporcionou importantes descobertas sobre suas características estruturais principais e sobre como essa estrutura permite o funcionamento da proteína. Seu grande domínio N-terminal de 621 resíduos de aminoácidos, que está exposto ao espaço extracelular (chamado **ectodomínio**), estava claramente envolvido no reconhecimento e ligação ao EGF. O receptor EGF possui um segundo domínio distinto, que é característico de muitas glicoproteínas de superfície celular; esse domínio **transmembrana** de 23 resíduos de aminoácidos faz seu caminho de fora da célula, através da bicamada lipídica da membrana plasmática, para o citoplasma. A existência de um domínio transmembrana pôde ser deduzida a partir da presença de uma linha contínua de resíduos de aminoácidos **hidrofóbicos**, localizados no meio da seqüência da proteína; esse domínio da proteína EGF-R reside confortavelmente no ambiente bastante hidrofóbico da bicamada lipídica da membrana plasmática. Por fim, um terceiro domínio de 542 resíduos na porção C-terminal (i. e., a extremidade da cadeia sintetizada por último) do receptor EGF foi descoberto, estendendo-se para o interior do citoplasma (Figura 5.9).

A estrutura total do receptor EGF sugeriu as principais questões sobre seu funcionamento. Após a ligação do ectodomínio a EGF, um sinal é transmitido através da membrana plasmática para ativar o domínio citoplasmático do receptor; uma vez ativado, ele emite sinais que induzem a célula a crescer e dividir-se. O exame desse domínio citoplasmático revelou uma clara similaridade de sequência com a da já conhecida proteína Src (Figura 5.9A).

Subitamente, tornou-se claro como o receptor de EGF emite sinais para o interior celular: uma vez que seu ectodomínio liga-se a EGF, de alguma forma a cinase semelhante à Src de seu domínio citoplasmático torna-se ativada, fosforilando tirosinas de certas proteínas citoplasmáticas, causando assim a proliferação celular. Esforços subsequentes de sequenciamento revelaram grande similaridade entre diversas tirosina cinases, muitas das quais podem atuar como oncoproteínas (Figura 5.9B).

Desde essas primeiras análises da estrutura do receptor EGF, um grande número de outros receptores, similares em estrutura, tem sido caracterizado (Figura 5.10). Conforme será discutido depois, cada um desses receptores tem seu próprio fator de crescimento ligante ou grupo de ligantes (Tabela 5.1). Dependendo do tipo particular de par receptor-fator de crescimento, a ligação de um ligante a seu receptor pode desencadear múltiplas respostas biológicas na célula, além de estimular crescimento e divisão celular. Dentre tais respostas, destacam-se mudanças na forma da célula, sobrevivência celular, **motilidade** (movimento). É interessante observar que esses receptores e seus ligantes representam invenções evolutivas relativamente recentes (Barra lateral 5.2).

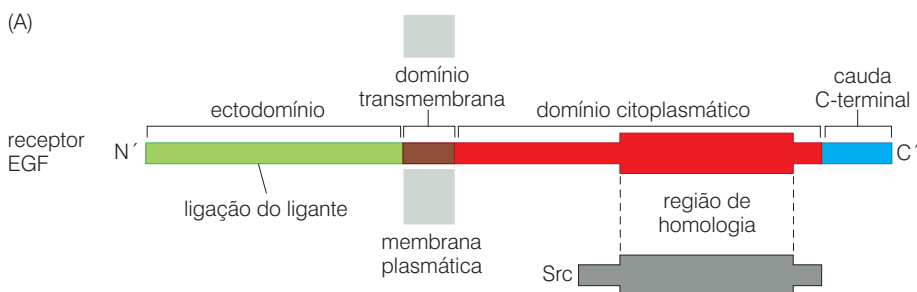


Figura 5.9 Estrutura do receptor EGF (A) O receptor para fator epidérmico de crescimento (EGF-R) é uma proteína complexa com um domínio extracelular (ectodomínio, verde), um domínio transmembrana que percorre a membrana plasmática (marrom) e um domínio citoplasmático (vermelho, azul). (B) Comparação das seqüências de aminoácidos (usando o código que representa cada aminoácido por uma única letra) do domínio citoplasmático de EGF-R com Src revelou áreas de identidade de seqüência (verde), sugerindo que EGF-R (representado aqui por "ErbB"), como Src, emite sinais, atuando como uma tirosina cinase. Outras oncoproteínas virais, ainda, como Abl e Fes, compartilham similaridade de seqüência com essas duas. Ainda que as similaridades de seqüência pareçam bastante espalhadas (entre Src e ErbB) e revelem um número pequeno de resíduos compartilhados, esses resíduos em comum indicam uma clara relação evolutiva (homologia) entre essas proteínas. Também são mostradas as seqüências de outras duas oncoproteínas virais – as dos oncogenes *raf* e *mos* – que são mais distantemente relacionadas (são serina/treonina cinases) e compartilham ainda menos seqüências com Src e EGF-R. (Adaptada de G. M. Cooper, *Oncogenes*, 2nd ed. Boston and London: Jones e Barlett, 1995.)

(B)

Src	RESLRLEAK	LGSGCFGEVWMTW	NDTTR	----	VAIK	LKPGTMSPE	----	AF	LQEAQVMKK
Abl	RTDITMKHKL	GGGQYGEVYEGV	WKYSLT	----	VAVK	TLKEDTMEVE	----	EFL	KEAAMVKE
Fes	HEDLVGEQIG	RNFGEVFSGR	LADNTL	----	VAVK	SCRETLPPDI	----	AK	KFLQEA
ErbB	ETEFKKVKV	LGSGAFGTIYK	GLWIPEGEKVKIP	----	VAIKE	REATSPKANKEI	----	DE	AYVMAS
Raf	ASEVMLSTRIG	SGSFGIVYK	GKWHGD	----	VAVK	ILKVVDP	----	TPE	QLQAFNE
Mos	WEQVCLMHRL	GSGGFGSVY	KATYHGV	----	VAIK	QVKNCTDL	----	RAS	QSRFSWAELNIA
Src	LR	HEKLVQLY	AVVSEEP	----	IYIVIEY	MSK	----	GS	LLDFLK
Abl	IK	HPNLVQL	LGCTREPPFY	----	IITEFMTY	----	----	GN	LLDYLR
Fes	YS	HPNIVRL	IGVCTQKQPI	----	IYIVMELVQ	----	----	GD	FLTLRTEGAR
ErbB	VD	NPHVCR	LGICLTST	----	VQLITQL	MPY	----	GC	LLDYIREHKN
Raf	KTRHVN	I	LLFMGYMTKDN	----	LAIVTQWCEGSS	LYKHLHVQETK	----	----	FQMF
Mos	GLRHDN	IVRVVAA	STRTPEDSN	----	SLGTIIMEFGGN	VTLHQVIYDATRS	----	PE	PLSCRKQLSLG
Src	QL	VDMAAQI	ASGMAY	----	VERMNYVHRDL	RAANI	----	LV	GENLVCKVAD
Abl	VLL	YMATQI	SSAMEYLEK	----	KNFIHRDLA	ARNCLVGENHL	----	VKV	ADFGLSRLMT
Fes	TLL	QMVGDAA	AGMEYLEK	----	KNFIHRDLA	ARNCLVTEKNVL	----	KIS	DFGMSREEAD
ErbB	YL	LNWCVQI	AKGMNLE	----	ERRLVHRDLA	ARNLV	----	KTP	QHVKITDFGLAKL
Raf	QL	IDIA	ARQTAQGM	----	DYLVHAKNI	IHRDMKSN	----	NLFL	HEGLTVKIGD
Mos	KCL	KYSLDV	VNGLLFL	----	HSQSILHLD	LKPANIL	----	ISE	QDVCKISDFGCS
Src	AKF	----	PIKWTAP	----	EALYGR	----	----	FT	IKSDVWSFGILL
Abl	AKF	----	PIKWTAP	----	ESLAYNK	----	----	FS	IKSDVWAFGVLL
Fes	LRL	V	PKWTAP	----	EALNYGR	----	----	YS	ESDVWSFGILL
ErbB	GGK	V	PIKWMAL	----	ESILHRI	----	----	YTH	QSDVWSYGV
Raf	QPTG	----	SVLWMAPE	----	IVIRMQDDN	PNPFSQSDV	----	YSY	GVIVLYELMA
Mos	PHIG	----	GYTHQAP	----	EILKGEI	----	----	ATP	KADIYSFGITLWQMTT
Src	R	----	GYRMP	----	CPPECP	ESLHD	----	LM	CQWRKDPEERPT
Abl	K	----	DYMER	----	PEGCEPK	VYE	----	LM	RACWQWNP
Fes	K	----	GGRL	----	CPPELCP	DAVFR	----	LM	EQCWAYEP
ErbB	K	----	GGRL	----	CPPELCP	DAVFR	----	LM	EQCWAYEP
Raf	GR	----	GYASPD	----	LSRLYKNC	PKAIKRL	----	VAD	CVKKVKEERPL
Mos	YN	----	LRPSLAG	----	AVFTASL	TGKALQNI	----	IQ	SCWEARGLRPSAELL

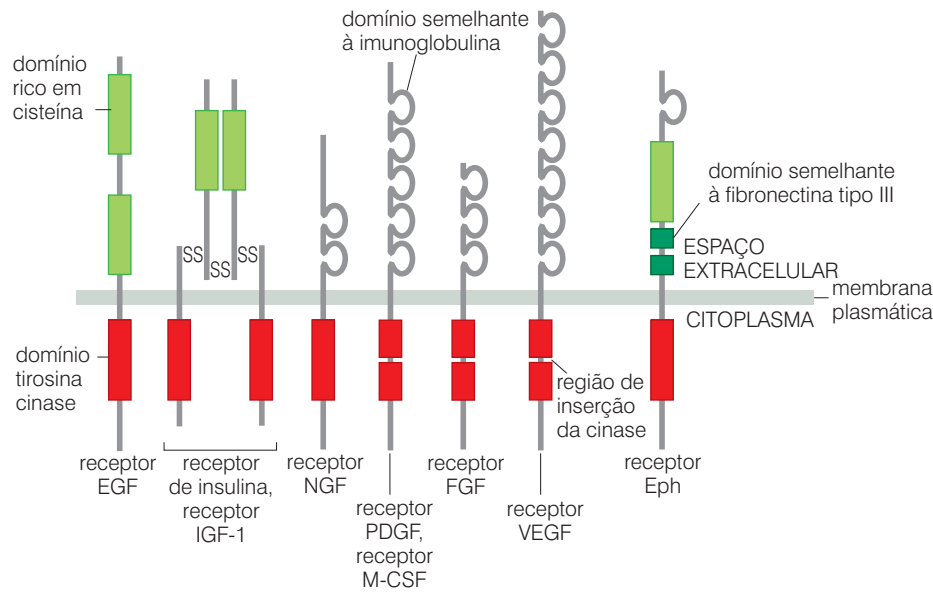


Figura 5.10 Estrutura dos receptores tirosina cinase O receptor EGF (Figura 5.9) é apenas um dentre um grande número de receptores similares em estrutura que são codificados pelo genoma humano. Esses receptores de tirosina cinase (RTKs) podem ser agrupados em famílias distintas, de acordo com detalhes de sua estrutura. Representantes da maioria dessas famílias estão representados aqui. Todos compartilham domínios tirosina cinase citoplasmáticos bastante similares (vermelho), ainda que em alguns casos (como o receptor PDGF), o receptor tirosina cinase seja interrompido no meio por pequenas regiões de inserção. Os ectodomínios desses receptores (que estão expostos no espaço extracelular, verde, cinza) possuem estruturas altamente variáveis, refletindo o fato de que eles reconhecem e se ligam a um número grande de ligantes extracelulares diferentes. (de B. Alberts et al., Molecular Biology of the Cell, 4th ed. New York: Garland Science, 2002.)

5.4 Um receptor de fator de crescimento alterado pode atuar como uma oncoproteína

Uma “bomba” caiu em 1984 quando a sequência do receptor EGF foi reconhecida como proximamente relacionada à sequência de uma oncoproteína conhecida, especificada pelo oncogene *erbB*. Esse oncogene havia sido originalmente descoberto no genoma de um vírus de eritroblastose aviária (AEV), um retrovírus transformante que rapidamente induz leucemia em precursores de células vermelhas do sangue (uma **eritroleucemia**).

Tabela 5.1 Fatores de crescimento (GFs) e receptores tirosina cinase que estão frequentemente envolvidos na patogênese de um tumor

Nome do GF	Nome do receptor	Células que respondem ao GF
PDGF ^a	PDGF-R	Endoteliais, VSMCs, fibroblastos, outras células mesenquimais, células gliais.
EGF ^b	EGF-R ^c	Muitos tipos de células epiteliais, algumas células mesenquimais.
NGF	Trk	Neurônios.
FGF ^d	FGF-R ^e	Endoteliais, fibroblastos, outras células mesenquimais, VSMCs, células neuroectodermas.
HGF/SF	Met	Várias células epiteliais.
VEGF ^f	VEGF-R ^g	Células endoteliais de capilares, ductos linfáticos.
IGF ^h	IGF-R1	Vasta gama de tipos celulares.
GDNF	Ret	Células neuroectodermas.
SCF	Kit	Hematopoiéticas, células mesenquimais.

VSMC = célula vascular de músculo liso.

^a PDGF é representado por quatro polipeptídeos distintos, PDGF-A, B, C e D. Os PDGF-Rs consistem em no mínimo duas espécies distintas, α e β , que podem homodimerizar ou heterodimerizar e associar-se aos ligantes de diferentes formas.

^b A família de ligantes EGF, todos os quais ligam ao EGF-R (ErbB1) e/ou a heterodímeros de erbB1 e um dos seus receptores relacionados (nota c), inclui – juntamente com EGF – TGF- α , HB-EGF, anfirregulina, betacelulina e epirregulina.

^c A família EGF-R de receptores consiste em quatro proteínas distintas, ErbB1 (EGF-R), ErbB2 (HER2, Neu), ErbB3 (HER3) e ErbB4 (HER4). Elas frequentemente ligam-se a ligantes como receptores heterodiméricos, por exemplo, ErbB1 + ErbB3, ErbB1 + ErbB2 ou ErbB2 + ErbB4; ErbB3 é desprovida de atividade de cinase e é fosforilada por ErbB2 quando as duas formam heterodímeros. ErbB3 e ErbB4 ligam neurorregulinas, uma família de mais de 15 ligantes gerados por *splicing* alternativo. Já que ErbB3 não possui atividade intrínseca de cinase, ela torna-se fosforilada em complexos heterodiméricos pela ErbB2, a qual não possui ligantes próprios, mas possui forte atividade de tirosina cinase.

^d FGFs são uma grande família de GFs. Os protótipos são FGF ácida (aFGF) e FGF básica (bFGF); existem também outros membros conhecidos dessa família.

^e Existem quatro FGF-Rs bem-caracterizados.

^f Existem quatro VEGFs conhecidos. VEGF-A e B estão envolvidos na angiogênese, enquanto VEGF-C e D estão envolvidos predominantemente em angiogênese linfática.

^g Existem três VEGF-Rs conhecidos: VEGF-R1 (também conhecido como Flt-1) e VEGF-R2 (também conhecido como Flk-1/KDR), envolvidos em angiogênese; VEGF-R3 está envolvido na angiogênese linfática.

^h As duas IGFs conhecidas, IGF-1 e IGF-2, ambas relacionadas em estrutura à insulina, estimulam o crescimento celular (aumento de tamanho) e a sobrevivência; elas também parecem ser mitogênicas.

Adaptada, em parte, de B. Alberts et al., Molecular Biology of the Cell, 4th ed. New York: Garland Science, 2002.

Barra lateral 5.2 Arquitetura celular nova e velha Os mecanismos de comunicação célula-célula são uma invenção relativamente recente na história da vida na Terra. As células vivas mais jovens parecem ter surgido há 3,5 bilhões de anos. Pelos 2,8 bilhões de anos ou mais seguintes, a vida na Terra esteve representada exclusivamente por organismos unicelulares, primeiro na forma de procaríotos e, então, de eucariotos. Apenas nos últimos 600 a 700 milhões de anos as células aprenderam a “conversar” umas com as outras de formas que as permitissem formar tecidos complexos e criar corpos de metazoários e plantas.

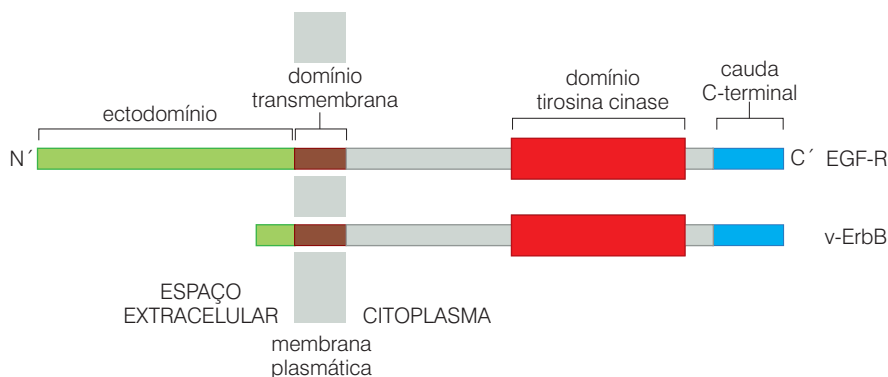
Essa aquisição relativamente recente de habilidades de comunicação intercelular tem implicações para as proteínas dentro de nossas células e para aquelas na superfície destas. A grande maioria de proteínas intercelulares encontrada em metazoários é de linhagens muito antigas. Muitas das atividades que essas proteínas realizam, como metabolismo energético, síntese de macromoléculas, crescimento e divisão celular, já eram centrais para as vidas de eucariotos unicelulares há 1,5 bilhão de anos. Por essa razão, as funções de muitas de nossas proteínas intercelulares podem ser vastamente estudadas por meio do exame do comportamento de seus homólogos nas células de levedura de pão e de leveduras em fissão.

As proteínas celulares na superfície das células, bem como as proteínas trocadas entre células, são relativamente novidades. Na grande maioria dos casos, seus antecedentes não podem ser encontrados entre as proteínas sintetizadas por eucariotos unicelulares. Muitas dessas proteínas novas foram inventadas quando a vida dos metazoários surgiu e foram mantidas de forma claramente reconhecível na maioria e provavelmente em todos os metazoários modernos. Isso explica porque nosso conhecimento de fatores de crescimento e a forma como eles sinalizam, conforme apresentado neste capítulo, foram muito enriquecidos pelas poderosas técnicas genéticas que permitem que os pesquisadores dissequem os sistemas de comunicação célula-célula de organismos metazoários mais simples, como vermes e moscas.

De uma só vez, duas áreas da biologia celular foram unidas. Uma proteína utilizada pela célula para sentir a presença de um fator de crescimento em seus arredores foi adotada (na sua forma aviária) e convertida em uma potente oncoproteína codificada por retrovírus.

Uma vez examinada em detalhe, a oncoproteína especificada pelo oncogene *erbB* do vírus da eritroblastose aviária foi descoberta como não possuidora de seqüências presentes no ectodomínio N-terminal do receptor de EGF (Figura 5.11). Sem essas seqüências N-terminais, a oncoproteína ErbB claramente não poderia reconhecer e ligar-se ao EGF, e, ainda assim, ela atuava como um potente estimulador da proliferação celular. Essa conscientização levou a uma especulação interessante que logo foi validada: de alguma forma, a deleção do ectodomínio permitiu que a proteína receptora EGF-truncada resultante enviasse sinais estimulatórios de crescimento para células de modo constitutivo, completamente independente de EGF. Conforme indicado na figura 5.12A, mutações em genes que codificam receptores de fatores de transcrição, incluindo os receptores especificamente truncados, podem desencadear uma ativação desses receptores de forma independente do ligante. De fato, uma variedade de mutações, incluindo as que criam substituições de aminoácidos no domínio transmembrana (mostrado), no ectodomínio ou nos domínios citoplasmáticos (não-mostrados), de alguns receptores podem provocar ativação independente de ligante. (No Capítulo 16, veremos o quanto receptores alterados estruturalmente influenciam a responsividade de tumores humanos a drogas terapêuticas anticâncer.)

Figura 5.11 O receptor EGF e v-ErbB O receptor EGF e a oncoproteína v-ErbB do vírus da eritroblastose aviária são proximamente relacionados um ao outro. Mais especificamente, a proteína v-ErbB é especificada por uma versão alterada do gene que codifica para o receptor EGF da galinha, o qual codifica uma forma truncada de EGF-R, que não possui a maior parte do ectodomínio normalmente presente (*verde*). Tal receptor truncado pode emitir sinais mitogênicos constitutivamente, isto é, sem ser estimulado pelo ligante EGF.



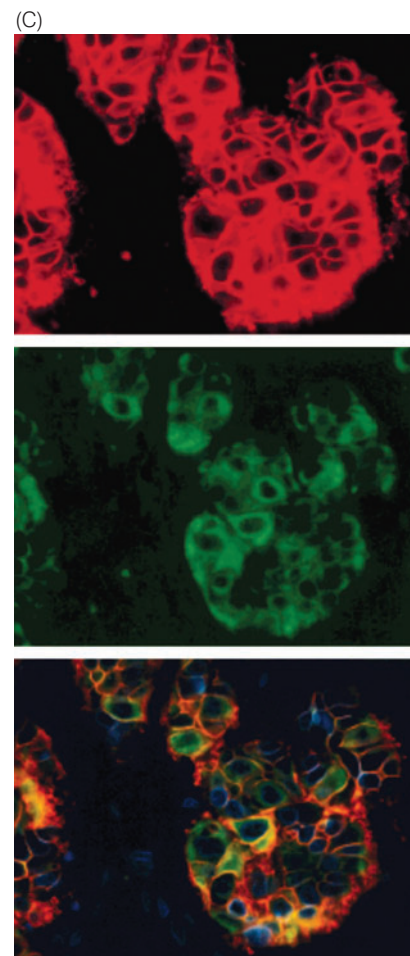
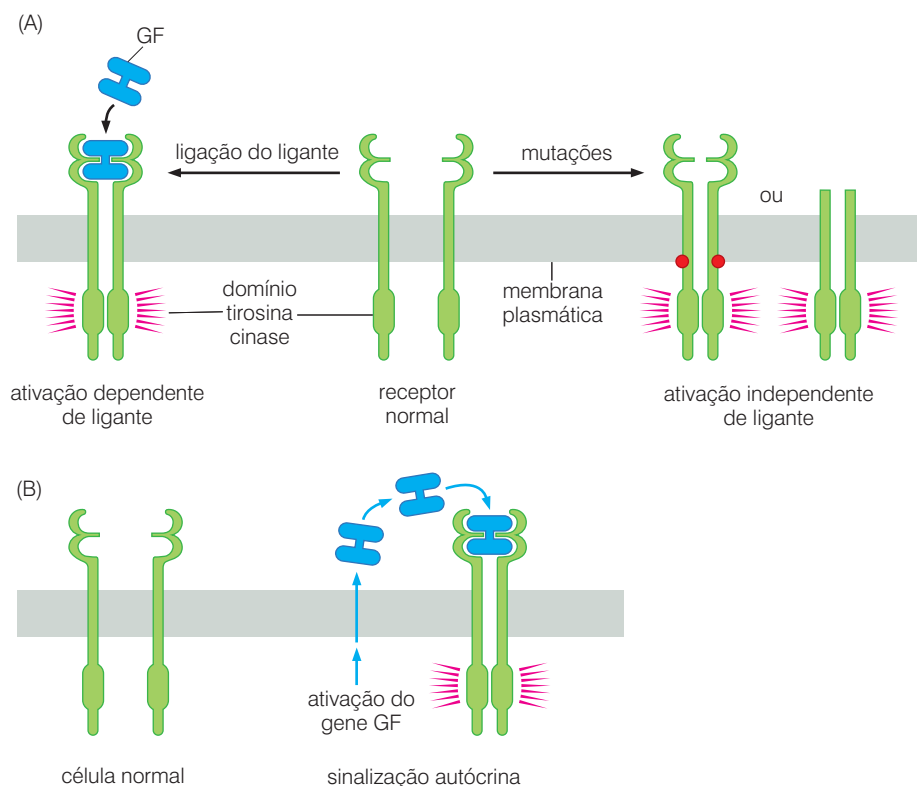


Figura 5.12 Desregulação da ativação de um receptor (A) Um receptor de fator de crescimento funcionando normalmente emite sinais (vermelho) em resposta à ligação com o ligante (azul, esquerda). No entanto, mutações nos genes que codificam as moléculas receptoras (direita) podem causar alterações sutis na estrutura da proteína, como substituições de aminoácidos (pontos vermelhos), que podem causar a ativação independente de ligante. Alterações mais drásticas na estrutura do receptor, incluindo um ectodomínio truncado (conforme Figura 5.11), também podem desencadear essa sinalização errônea. (B) Em geral, células não sintetizam e liberam um fator de crescimento ligante cujo receptor correspondente elas também apresentam. No entanto, em muitos tipos de câncer, células tumorais adquirem a capacidade de expressar um fator de crescimento (azul) que não é normalmente expresso por células de sua linhagem, cujo receptor cognato pode já estar sendo expresso. Isso cria uma sinalização autócrina, ou auto-estimulação, cíclica. (C) Um exemplo disso é visto nas seções sucessivas de um carcinoma humano invasivo de mama, no qual ilhas de células cancerígenas estão cercadas por estroma não-corado (preto). A seção mais acima foi imunocorada para a expressão de TGF- α , um ligante do receptor EGF (verde). Quando essas duas imagens são sobrepostas (painel mais abaixo), células que expressam o receptor e o ligante aparecem coradas de amarelo; núcleos brancos estão corados de azul. (C, de J. S. de Jong et al., *J. Pathol.* 184:44-52, 1998.)

Essas descobertas acerca do funcionamento de receptores propiciaram uma solução para um problema há muito existente na biologia celular do câncer. Conforme mencionado anteriormente, células normais eram conhecidas por necessitarem de fatores de crescimento em seu meio de cultura para que pudessem crescer. Células cancerígenas, pelo contrário, eram sabidamente menos dependentes de fatores de crescimento para seu crescimento e sobrevivência. A descoberta da conexão ErbB-EGF-R originou uma explicação simples e apropriada para esse traço particular das células cancerígenas: a oncoproteína ErbB libera sinais muito similares àqueles emitidos por um receptor ativado pelo ligante EGF. No entanto, diferentemente do receptor EGF, a oncoproteína ErbB é capaz de enviar para a célula sinais estimuladores de crescimento constantes e insistentes, persuadindo, assim, a célula de que quantidades substanciais de EGF estão presentes em seus arredores, quando na verdade não há nenhum.

Barra lateral 5.3 Superexpressão do receptor é resultado de muitos mecanismos moleculares

A superexpressão de um fator de crescimento na superfície da célula é alcançada por meio de inúmeros mecanismos moleculares distintos. Em algumas células cancerígenas, os receptores são superexpressos porque o gene codificante é transcrito em uma taxa muito elevada, resultando em níveis correspondentemente aumentados de mRNA e proteína. Alternativamente, em um grande número de cânceres humanos, esses genes de receptores com frequência são amplificados, levando, outra vez, a níveis proporcionalmente altos de transcritos de mRNA e da proteína receptora.

Outros mecanismos, ainda mais sutis, também podem ser responsáveis por números elevados de moléculas de receptor na superfície celular. Um desses deriva dos mecanismos que governam o *tempo de vida* de moléculas de receptor na superfície celular. Muitos receptores apresentam-se na superfície apenas por um tempo limitado, antes de serem internalizados pelo mecanismo conhecido como **endocitose**, em que uma porção

de membrana plasmática, juntamente com proteínas associadas, é posta no citoplasma, onde essa porção forma uma vesícula. Após, o conteúdo da vesícula pode ser despachado aos **lisossomos**, nos quais é degradado, ou pode ser novamente reciclado para a superfície celular.

Uma proteína, chamada HIP1, é parte de um complexo de proteínas que participa e facilita a endocitose. HIP1 foi descoberta como superexpressa em uma vasta gama de cânceres humanos. Por razões ainda pouco entendidas, a superexpressão de HIP1 previne a endocitose normal de uma série de proteínas de superfície celular, incluindo o receptor EGF (EGF-R). Como consequência, células que superexpressam HIP1 acumulam níveis excessivos de EGF-R na superfície celular e, no caso de fibroblastos NIH 3T3 de camundongo, tornam-se indiferentes a EGF. Isso explica porque tais células são capazes de crescer vigorosamente na presença de níveis muito baixos de soro (0,1%), que fazem com que células normais se retraiam para um estado quiescente, de pausa no crescimento. Além disso, essas células tornam-se transformadas na presença de 10% de soro no meio de cultura teci-

dual – a concentração de soro que é utilizada rotineiramente para propagar células NIH 3T3 não-transformadas.

Outra proteína, chamada cinase associada à ciclina G, é uma forte promotora da endocitose de EGF-R. Quando sua expressão é suprimida, os níveis de EGF-R na superfície celular elevam-se até 50 vezes. Seu nível de expressão em tumores humanos ainda não foi medido. Uma terceira proteína, chamada c-Cbl, é responsável por identificar os EGF-Rs ativados pelo ligante, por meio da modificação covalente chamada de monoubiquitinação (a ser descrita na Barra lateral 7.8). Essa identificação causa a endocitose de EGF-R e sua subsequente degradação nos lisossomos. A oncoproteína viral v-Cbl, bem como muitas proteínas celulares (Sts-1, Sts-2), é capaz de bloquear essa endocitose, resultando, mais uma vez, no acúmulo de níveis elevados de EGF-R na superfície celular. De modo mais geral, a hiper-responsividade a fatores de crescimento, resultante da superexpressão do receptor, é capaz de direcionar muitos tipos celulares humanos de câncer à proliferação *in vivo*.

Conforme mencionado na Seção 4.6, agora somos capazes de perceber que versões truncadas do receptor EGF podem ser encontradas em vários tipos de tumores celulares. Em muitos cânceres de pulmão, por exemplo, o mRNA de EGF-R não possui as seqüências codificantes dos éxons 2 a 7. Essa deleção, que remove seqüências que especificam grande parte do ectodomínio do receptor, freqüentemente resultam de *splicing* alternativo do precursor de mRNA. Mais comumente, um grande número de receptores de fatores de crescimento que se configuram como o receptor EGF têm sido identificados em tumores humanos como superexpressos (veja a Barra lateral 5.3) ou sintetizados de forma alterada estruturalmente (Tabela 5.2).

5.5 Um gene de fator de crescimento pode se tornar um oncogene: o caso de *sis*

A noção de que oncoproteínas podem ativar vias de sinalização mitogênicas recebeu um grande estímulo quando o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) foi isolado e sua seqüência de aminoácidos determinada. Em 1983, a cadeia B do PDGF foi descoberta como proximamente relacionada em seqüência à da oncoproteína codificada pelo oncogene *v-sis* do vírus do sarcoma de símios. Novamente, o estudo de oncogenes realizado por rápida transformação com retrovírus serviu muito bem aos propósitos.

A proteína PDGF foi descoberta como não-relacionada em estrutura à EGF e como estimuladora do crescimento de tipos celulares diferentes. PDGF estimula fortemente células mesenquimais, como fibroblastos, adipócitos, células de músculo liso e células endoteliais, ao passo que as atividades mitogênicas de EGF estão focadas, em sua maior parte (mas não inteiramente), em células epiteliais. Essa especificidade de ação pôde ser compreendida quando o receptor PDGF foi isolado: o PDGF-R era expresso na superfície das células mesenquimais, não sendo encontrado em células epiteliais, enquanto o EGF-R demonstra um padrão oposto de expressão. (Da mesma forma que o receptor EGF, PDGF-R utiliza uma tirosina cinase no seu domínio citoplasmático para propagar sinais para dentro da célula; veja a Figura 5.10.)

Tabela 5.2 Receptores tirosina cinase alterados em tumores humanos^a

Nome do receptor	Principal ligante	Tipo de alteração	Tipos de tumor
EGF-R/ErbB1	EGF, TGF- α	Superexpressão	Câncer pulmonar de células não-pequenas, mama, cabeça e pescoço, estômago, colorretal, esôfago, próstata, bexiga, rins, pâncreas, carcinomas ovarianos, glioblastoma
EGF-R/ErbB1		Ectodomínio truncado	Glioblastoma, carcinomas de pulmão e mama
ErbB2/HER2/Neu	NRG, EGF	Superexpressão	30% dos adenocarcinomas de mama
ErbB3, 4	Vários	Superexpressão	Carcinoma oral escamoso
Flt-3	FL	Duplicação em <i>tandem</i>	Leucemia mielógena aguda
Kit	SCF	Substituição de aminoácidos	Tumor de estroma gastrointestinal
Ret		Fusão com outras proteínas, mutações pontuais	Carcinomas papilares e de tireóide, múltiplas neoplasias endócrinas 2A e 2B
FGF-R3	FGF	Superexpressão, substituição de aminoácidos	Mielomas múltiplos, carcinoma cervical e de bexiga

^a Veja também a Figura 5.17.

A conexão entre PDGF e a oncoproteína codificada por *sis* sugeriu outro importante mecanismo pelo qual oncoproteínas poderiam transformar células: o vírus do sarcoma de símios infecta uma célula, e o oncogene *sis* faz com que essa célula infectada libere para o meio circundante imensas quantidades de uma proteína *Sis* semelhante ao PDGF. Uma vez no espaço extracelular, essas moléculas semelhantes a PDGF ligam-se ao PDGF-R presente na própria célula que recém as sintetizou e liberou. O resultado é uma forte ativação dos receptores PDGF da célula e, conseqüentemente, uma inundação da célula com um fluxo constante de sinais estimulatórios de crescimento, liberados pelo PDGF-R ativado por ligante.

Essas descobertas também solucionaram um enigma existente havia muito tempo. Muitos tipos de retrovírus agudamente transformantes são capazes de transformar uma grande variedade de tipos celulares. O vírus do sarcoma de símios, no entanto, era capaz de transformar fibroblastos, falhando em transformar células epiteliais. A apresentação tipo-específica de PDGF-R explicou a diferente suscetibilidade à transformação pelo vírus do sarcoma de símios.

Mais uma vez, uma conexão foi forjada entre uma proteína envolvida na sinalização mitogênica e uma oncoproteína viral. Nesse caso, uma célula infectada por um vírus foi forçada a sintetizar e liberar um fator de crescimento ao qual ela também era capaz de responder. Mais do que um sinal de fator de crescimento enviado de um tipo de célula a outro tipo localizado nas proximidades (com frequência denominado sinalização **parácrina**) ou, ainda, um sinal enviado através da circulação de um tecido do corpo para outros tecidos mais distantes (sinalização **endócrina**), esse tipo de sinalização foi auto-estimulatório, ou **autócrino**. Neste caso, a célula fabrica seus próprios mitógenos (Figura 5.12B, C). (Um mecanismo de sinalização autócrino também explica como o vírus da leucemia de Friend, um outro retrovírus de camundongo, é capaz de provocar a doença; veja a Barra lateral 5.4.)

De fato, diversos tumores celulares humanos são conhecidos por produzirem e liberarem quantidades consideráveis de fatores de crescimento aos quais também são capazes de responder (Tabela 5.3). Alguns desses, como certos cânceres de pulmão, produzem até três fatores de crescimento distintos (fator de crescimento tumoral, ou TGF- α ; fator de célula-tronco, ou SCF; fator de crescimento semelhante à insulina, ou IGF) e, ao mesmo tempo, expressam os receptores desses três ligantes, estabelecendo três sinalizações autócrinas circulares simultaneamente. Esses círculos de sinalização parecem funcionalmente importantes para o crescimento de tumores. Por exemplo, em um estudo de pacientes com câncer pulmonar de células pequenas (SCLC), aqueles cujos tumores expressaram Kit, o receptor do fator de célula-tronco (SCF), sobreviveram, em média, apenas 71 dias após o diagnóstico de sua doença, ao passo que aqueles cujos tumores não expressavam Kit sobreviveram, em média, 288 dias.

Provavelmente o maior tumor autócrino é o sarcoma de Kaposi, um tumor de células proximalmente relacionadas às células endoteliais que formam os ductos da linfa (veja a Barra lateral 3.10). Até o presente momento, tumores de Kaposi foram documentados como produtores de PDGF,

Barra lateral 5.4 Sinalização autócrina resolve o mistério da gênese de leucemia pelo vírus da leucemia de Friend Houve uma ocasião na qual os poderes biológicos do vírus da leucemia murina de Friend (FLV) representavam um grande mistério. Esse vírus era capaz de induzir rapidamente eritroleucemias em camundongos, ainda que um exame cuidadoso do genoma viral falhasse em revelar qualquer oncogene aparente que pudesse ter sido adquirido do genoma celular, como era o caso de todos os outros retrovírus oncogênicos rápidos. Então, FLV parecia conter apenas os genes *gag*, *pol* e *env*, necessários para a replicação de qualquer retrovírus (veja a Figura 3.19).

Uma pista surgiu de um pequeno genoma retroviral que co-proliferava com FLV. Esse genoma menor, que aparentemente resultou da deleção da maioria dos genes de um genoma retroviral tipo selvagem, carregava apenas o gene para uma glicoproteína viral, ou seja, um gene similar a e derivado do gene retroviral *env*. (Em geral, as glicoproteínas codificadas por *env* são utilizadas pelos vírions dos retrovírus para que estes possam se ligar a células-alvo e fundar a membrana do virion à

membrana plasmática destas células.) Uma caracterização detalhada dessa glicoproteína, chamada gp55, resolveu o enigma das eritroleucemias induzidas por FLV. A proteína gp55 age mimetizando o fator de crescimento **eritropoetina** (EPO). Geralmente, quando a pressão de oxigênio no sangue é menor do que a normal, EPO é liberada nos rins e liga-se aos receptores de EPO presentes nas células da medula óssea que são precursores imediatos dos eritroblastos (precursores das células vermelhas maduras do sangue). Essa ativação dos EPO-R faz com que essas células aumentem em número e as estimula a se diferenciarem em **eritrócitos** (células vermelhas do sangue). Em camundongos infectados por FLV, a gp55 liberada por um eritroblasto infectado age de maneira autócrina na célula infectada, ligando-se e estimulando seus receptores EPO, levando a célula a proliferar. (As células precursoras de eritrócito resultantes acumulam-se em grandes números e sofrem mutações adicionais que as tornam neoplásicas.) Ainda não está claro como o vírus da leucemia de Friend obteve sucesso em remodelar uma glicoproteína retroviral em uma forma de EPO eficientemente mimetizada.

TGF-β, IGF-1, Ang-2, CCL8/14, CXCL11 e endotelina – todos ligantes de origem celular – bem como dos receptores para estes ligantes. Ao mesmo tempo, o agente causador dessa doença, o genoma do herpesvírus-8 humano (HHV-8) que está presente nas células tumorais de Kaposi, produz dois ligantes adicionais – vIL6 e vMIP – cujos receptores respectivos também são expressos pelos precursores de células endoteliais que geram esses tumores.

Na maioria desses casos, a expressão de genes celulares que codificam diversos fatores de crescimento mitogênicos está, de alguma forma, desregulada, resultando na produção de mitógenos em células que normalmente não expressam níveis significativos dessas proteínas celulares. Esse padrão de comportamento é agravado pelo HHV-8, que força as células infectadas a sintetizarem dois novos fatores de crescimento que não são codificados pelo genoma celular.

De uma forma mais geral, círculos de sinalização autócrina parecem representar perigos em potencial para tecidos e organismos. Em tecidos normais, a proliferação de células individuais depende quase sempre de sinais recebidos de outras células; tal interdependência assegura a estabilidade das populações celulares e a manutenção da arquitetura tecidual. Uma célula que adquiriu a capacidade de controlar sua própria proliferação (sintetizando seus próprios mitógenos) cria, portanto, um perigo iminente, já que ciclos de retroalimentação positiva, reforçando, com frequência levam a desregulações fisiológicas grosseiras.

Tabela 5.3 Exemplos de tumores humanos que produzem fatores de crescimento autócrinos

Ligante	Receptor	Tipo(s) de tumor
HGF	Met	Diversos tumores endócrinos, tumores invasivos de pulmão e mama, osteossarcoma
IGF-2	IGF-1R	Colorretal
IL-6	IL-6R	Mieloma, HNSCC
IL-8	IL-8R A	Câncer de bexiga
NRG	ErbB2 ^a /ErbB3	Carcinoma de ovário
PDGF-BB	PDGF-Rα/β	Osteossarcoma, glioma
PDGF-C	PDGF-α/β	Sarcoma de Erwing
PRL	PRL-R	Carcinoma de mama
SCF	Kit	Sarcoma de Erwing, SCLC
VEGF-A	VEGF-R (Flt-1)	Neuroblastoma, câncer de próstata, sarcoma de Kaposi
TGF-α	EGF-R	Célula escamosa de pulmão, adenocarcinoma de próstata e mama, câncer no pâncreas, mesotelioma
GRP	GRP-R	Câncer pulmonar de células não-pequenas

^a Conhecido também como HER2 ou receptor Neu.

Barra lateral 5.5 Sinalização autócrina influencia o desenvolvimento de terapias anticâncer

Testar a eficácia de uma nova droga anticâncer geralmente inicia com a análise da capacidade da droga de afetar o crescimento e/ou a sobrevivência de células cancerígenas em cultura (*in vitro*). Esses testes são então seguidos pela inserção dessas células cancerígenas em camundongos hospedeiros, nos quais elas poderão formar tumores (*in vivo*). A responsividade desses enxertos de tumor ao tratamento com as drogas administradas ao camundongo possuidor do tumor é freqüentemente utilizada para prever se uma droga em estudo possuirá eficácia clínica, ou seja, a capacidade de conter o crescimento de um tumor ou causar a diminuição deste.

Em algumas ocasiões, a responsividade *in vitro* de uma população de células tumorais pode prever seu comportamento *in vivo*; em outros casos, ela não será capaz. A experiência

de alguns desenhistas de drogas indica que esses comportamentos contrastantes correlacionam-se com a produção de fatores de crescimento autócrinos pelas linhagens celulares tumorais. Essas células cancerígenas, que produzem fatores de crescimento em abundância, normalmente respondem ao tratamento com drogas de forma similar *in vivo* e *in vitro*, ao passo que aquelas que não secretam fatores de crescimento comportam-se muito diferentemente nessas duas condições. Parece que as células tumorais secretoras de fatores autócrinos criam seu próprio ambiente de fatores de crescimento, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Por outro lado, aquelas que não secretam esses fatores dependem de mitógenos associados ao soro *in vitro* e dos fatores de crescimento fornecidos pelas células vizinhas *in vivo*, sendo que os últimos podem diferir muito do espectro de mitógenos presentes no soro.

A ativação desses círculos de sinalização autócrina possui conseqüências similares às que ocorrem quando uma proteína receptora estruturalmente alterada, como ErbB/EGF-R, é expressa por uma célula. Em ambos os casos, a célula gera seus próprios sinais mitogênicos, e a sua dependência em mitógenos exógenos é significativamente reduzida. Essa dinâmica também possui implicações importantes no desenvolvimento de drogas anticâncer (Barra lateral 5.5).

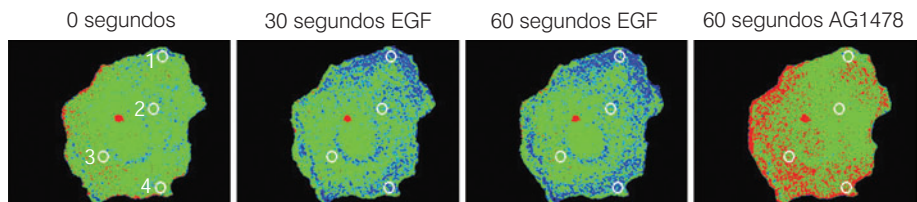
5.6 A transfosforilação é a base da operação de receptores tirosina cinase

As ações de oncogenes como *sis* e *erbB* fornecem uma explicação biológica satisfatória de como uma célula pode se tornar transformada. Munindo as células com um fluxo contínuo de sinais estimulatórios de crescimento, as oncoproteínas são capazes de direcionar ciclos repetidos de crescimento e divisão celular, necessários para que grandes populações de células cancerígenas acumulem-se e formem tumores. Porém, essa explicação biológica ainda deixa em aberto uma questão bioquímica importante, que diz respeito ao centro da sinalização mitogênica: como os receptores de fatores de crescimento contendo tirosina cinases (freqüentemente chamados de receptor tirosina cinase, ou RTKs) obtêm sucesso transduzindo sinais do espaço extracelular para o interior do citoplasma celular?

Sabendo da presença de atividade enzimática de tirosina cinase nos domínios citoplasmáticos dessas proteínas, podemos reformular a pergunta: como um receptor de fator de crescimento utiliza seu domínio tirosina cinase para emitir sinais em resposta à ligação de um ligante?

A solução para esse problema veio do exame detalhado das proteínas que se tornaram fosforiladas, segundos após a aplicação de um fator de crescimento como EGF, nas células que expressavam seu receptor correspondente – no caso, o EGF-R (Figura 5.13). Seria razoável que uma variedade de proteínas citoplasmáticas se tornasse fosforilada nos seus resíduos de tirosina após a adição de um ligante a um receptor de fator de crescimento. De fato, existe um grande número de proteínas que agem dessa forma. Porém, dentre essas proteínas que possuem fosfotirosinas, a que obteve maior destaque foi o próprio receptor (Figura 5.14)! Assim, esses receptores parecem ser capazes de autofosforilação.

Figura 5.13 Formação de fosfotirosina no EGF-R pela adição de um ligante. A utilização de um reagente fluorescente que se liga especificamente a um resíduo de fosfotirosina no EGF-R permite a visualização da ativação do receptor pela ligação de um ligante. Aqui, a ativação do receptor é medida em uma célula de rim de macaco em um nível basal (0 segundos), bem como 30 e 60 segundos após a adição de EGF. Junto a isso, após uma estimulação por dois minutos com EGF, os efeitos de um tratamento por 60 segundos com o inibidor químico da EGF-R cinase (AG1478) são mostrados (*direita*). A atividade acima do nível basal do receptor está indicada em *azul*, enquanto a atividade abaixo do nível basal está indicada em *vermelho*. A resposta ao tratamento com AG1478 indica que um nível significativo de atividade basal de EGF-R estava presente, mesmo antes da adição de EGF. (De M. Offterdinger et al., *J.Biol.Chem.* 279:36972-36981, 2004.)

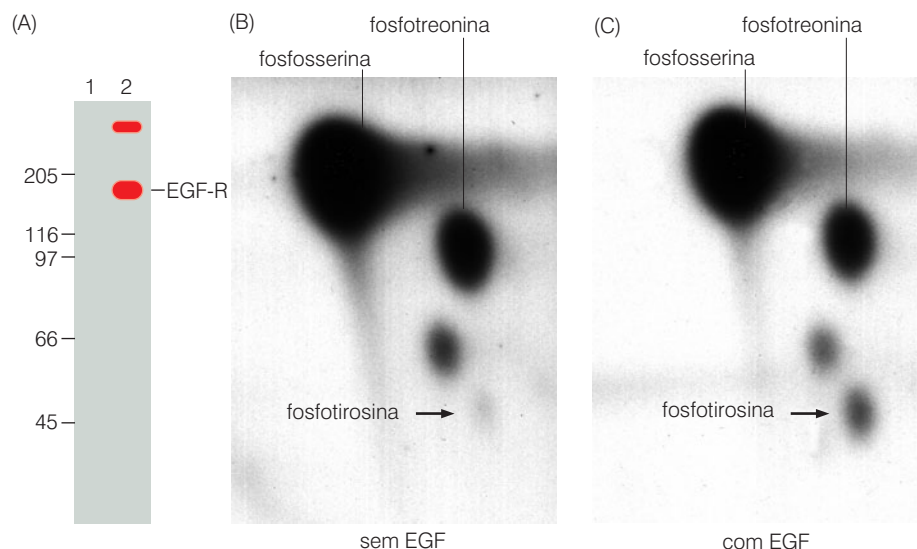


Outra pista veio da estrutura de muitos fatores de crescimento ligantes; eles foram descobertos como sendo **diméricos**, ou seja, compostos tanto por duas subunidades protéicas idênticas (**homodímeros**) quanto por subunidades similares, mas não idênticas (**heterodímeros**). Uma terceira dica veio de observações de que muitas proteínas transmembrana similares aos receptores EGF e PDGF possuem mobilidade lateral no plano da membrana plasmática. Ou seja, já que os domínios transmembrana dessas proteínas receptoras permanecem embebidos na bicamada lipídica da membrana, eles estão relativamente livres para se movimentarem para frente e para trás na superfície celular.

Unidos, esses fatos conduziram a um modelo simples. Na ausência de um ligante, o receptor de fator de crescimento existe na sua forma **monomérica** (uma subunidade), embebida na membrana plasmática. Quando encontra seu fator de crescimento ligante, que é um homodímero, uma molécula de receptor se ligará a uma dessas subunidades do ligante. Após, o complexo ligante-receptor irá vagar pela membrana plasmática até que encontre outra molécula de receptor, e, nessa ocasião, a segunda subunidade do ligante, ainda não comprometida, irá se ligar a essa segunda molécula de receptor. O resultado é uma ligação cruzada das duas moléculas de receptor mediada pelo ligante dimérico, que forma uma ponte entre os receptores (Figura 5.15). Estudos por cristalografia de raios X de fatores de crescimento ligados aos ectodomínios de seus receptores revelaram outros mecanismos pelos quais esses ligantes são capazes de induzir a dimerização dos receptores (Barra lateral 5.6).

Uma vez que a dimerização dos ectodomínios de duas moléculas de receptor foi alcançada pela ligação do ligante, as porções citoplasmáticas também são unidas. Agora, cada domínio cinase fosforila resíduos de tirosina presentes no domínio citoplasmático de outro receptor. Assim, o termo “autofosforilação” (veja a Figura 5.14) é, na verdade, uma falsa denominação. Essa fosforilação bidimensional, recíproca, é melhor descrita como um processo de **transfos-**

Figura 5.14 Autofosforilação aparente do receptor EGF (A) Quando células de carcinoma humano A431, que expressam EGF-R em grandes quantidades, são incubadas em um meio contendo $^{32}\text{PO}_4$ e então expostas ao EGF, uma proteína marcada radioativamente pode ser imunoprecipitada com um anti-soro anti-fosfotirosina (*canaleta 2*); essa proteína migra juntamente com EGF-R na eletroforese em gel e não é detectada na ausência de tratamento anterior com EGF (*canaleta 1*). (B) Estão mostrados aqui os fosfoaminoácidos marcados com $^{32}\text{PO}_4$ das proteínas cujas células não foram tratadas com EGF (resolvido por eletroforese; veja a Figura 5.8). (C) Após a adição de EGF às células A431, um ponto se torna mais escuro na porção direita inferior; marcadores internos indicam que ele representa uma fosfotirosina, e não uma fosfoserina ou fosfotreonina. (A, de A. B. Sorokin et al., *FEBS Lett.* 268:121-124, 1990; B e C, cortesia de A. R. Frackelton Jr.)



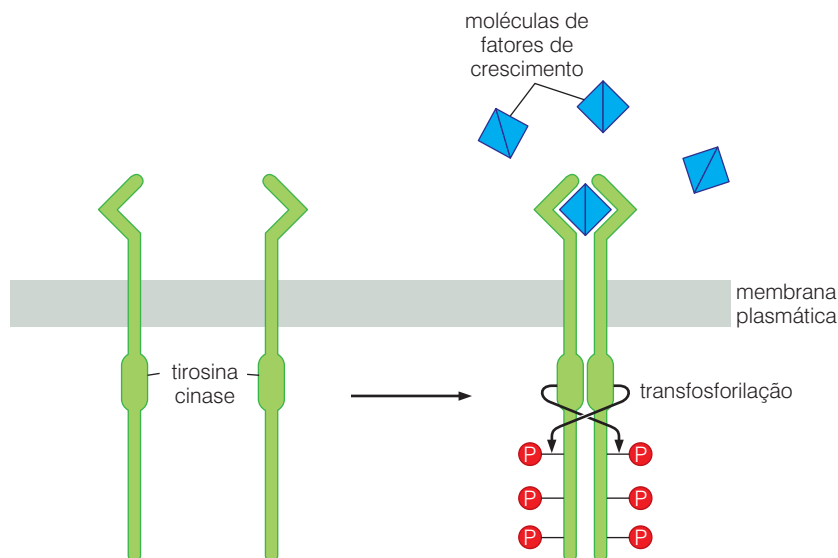


Figura 5.15 Dimerização do receptor após a ligação do ligante. Este esquema indica como muitos fatores de crescimento podem ser ativados para emitirem sinais. Na ausência de ligante, moléculas de receptor (verde) estão livres para se mover lateralmente no plano da membrana plasmática. Na presença do fator de crescimento ligante, duas moléculas de receptor são unidas, formando um dímero. Uma vez que o receptor está dimerizado, o domínio tirosina cinase de cada subunidade de receptor é capaz de fosforilar a cauda C'-terminal citoplasmática da outra subunidade – o processo da transfosforilação (setas).

forilação (veja a Figura 5.15). (De fato, não está claro se uma única molécula cinase isolada é capaz de fosforilar a si mesma.)

A fosforilação desses resíduos de tirosina pode possuir no mínimo duas conseqüências. A fenda catalítica de uma cinase – a região da proteína na qual sua função enzimática ocorre – pode ser parcialmente obstruída por uma alça da proteína, prevenindo a cinase de interagir efetivamente com seus substratos. A transfosforilação de uma tirosina crítica, na “alça de ativação” obstruída, faz com que a alça saia do caminho, o que permite que a fenda catalítica possua acesso direto às suas moléculas de substrato. Além disso, a transfosforilação resulta na fosforilação de resíduos de tirosina presentes nas porções citoplasmáticas do receptor de fator de crescimento, fora do domínio cinase, conforme indicado na Figura 5.15. Como veremos a seguir, esses eventos de fosforilação permitem que a molécula de receptor fosforilada resultante ative diversas vias de sinalização *downstream*.

O modelo de dimerização do receptor explica como receptores de fatores de crescimento podem participar da formação de cânceres quando as moléculas de receptor são superexpressas, ou seja, apresentadas na superfície celular em níveis que excedem muito os vistos em células normais (veja a Barra lateral 5.3). Já que esses receptores estão livres para se movimentarem lateralmente no plano da membrana plasmática, seu alto número faz com que eles colidam freqüentemente, e, esses encontros, como eventos de dimerização desencadeados pela ligação do ligante, podem resultar em transfosforilação, ativação do receptor e emissão de sinal. O receptor EGF é superexpresso em um grande número de tumores humanos, principalmente carcinomas, conforme indicado na Tabela 5.2. Em tais tumores, essa superexpressão pode resultar na dimerização e ativação de receptor de forma independente de ligante. Alternativamente, a expressão excessiva do receptor de EGF pode tornar algumas células cancerígenas hiper-responsivas aos níveis baixos dos ligantes EGF e TGF- α que podem estar presentes nas redondezas.

Em geral, é difícil distinguir esses dois mecanismos alternativos. Um grupo de experimentos, no entanto, fornece uma indicação não-ambígua de que a superexpressão do receptor pode agir por meio do primeiro desses mecanismos – dimerização e ativação independente de ligante. Nesse experimento, o receptor humano Met (cujo ligante é HGF/SF) foi superexpresso em células de fígado de camundongo de uma linhagem geneticamente alterada; isso acarretou, por sua vez, o desenvolvimento de carcinomas hepatocelulares (HCCs). O receptor humano Met não é capaz de se ligar ao ligante HGF/SF, o que indica que a ativação observada no receptor, bem como a transformação celular, poderia ser descrita como um processo independente do ligante, uma dimerização espontânea específica de moléculas de Met superexpressas.

Barra lateral 5.6 Fatores de crescimento induzem a dimerização de receptor de muitas formas Na realidade, o modelo simples de dimerização de receptor mostrado na Figura 5.15 representa o comportamento de apenas um pequeno grupo de receptores de fator de crescimento. Esse modelo se aplica, por exemplo, ao fator de crescimento de nervos (NGF) e seu receptor Trk e ao fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e seu receptor Flt-1 (Figura 5.16A). No entanto, no caso do fator de crescimento de fibroblastos (FGF), as moléculas de fator de crescimento são monômeros que não entram diretamente em contato. Em vez disso, um par de moléculas de FGF é unido pela ligação comum de uma molécula de heparina; cada um dos monômeros então atrai uma molécula de FGF-R, causando a dimerização (Figura 5.16B).

Outros fatores de crescimento funcionam como cadeias polipeptídicas únicas. Então, uma única molécula de eritropoetina (EPO) é capaz de contatar simultaneamente duas moléculas de receptor, causado assim sua dimerização (*não-mostrado*). Outros ligantes podem ainda atuar como heterodímeros. No caso do receptor EGF, duas moléculas de ligante (como EGF ou um ligante EGF-R chamado TGF- α) ligam-se como monômeros a receptores também monoméricos; essa ligação faz com que dois desses receptores ativados por ligante exponham seus domínios de dimerização dos ectodômios opostos aos sítios de ligação de ligante e associem-se um ao outro sem qualquer conexão entre os dois monômeros ligantes (Figura 5.16C).

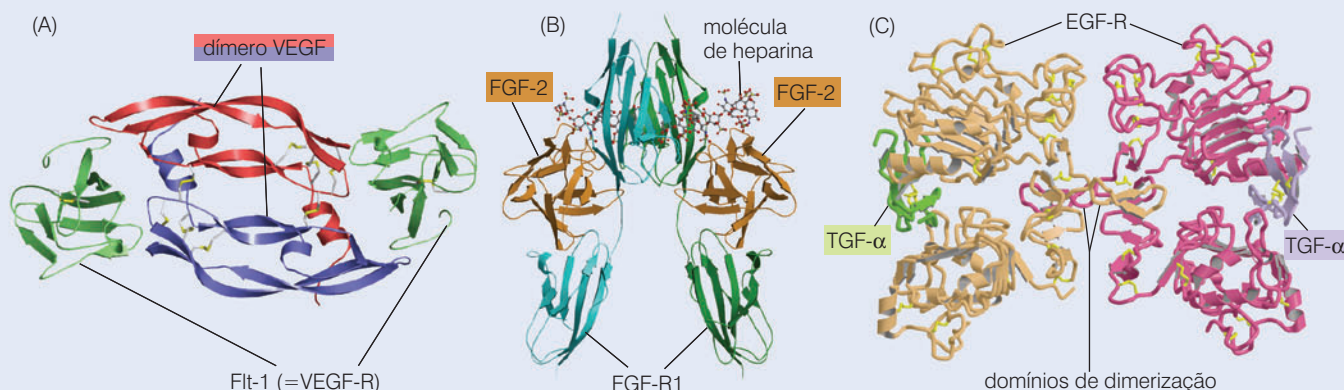


Figura 5.16 Mecanismos alternativos para a dimerização de receptores induzida por fatores de crescimento A cristalografia de raios X revelou como diversos fatores de crescimento ligantes causam a dimerização de receptores. (A) O fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) liga-se como um dímero (*vermelho, azul*) a dois monômeros do seu receptor, chamado Flt-1 (*verde*), aproximando-os. Esse complexo está sendo visualizado de baixo para cima, ou seja, a partir da membrana plasmática, olhando-se para fora desta. (B) No caso do receptor de fator de crescimento de fibroblasto-1 (FGF-R1), cada um dos ligantes FGF-2 (*laranja-escuro*) se liga ao domínio de ligação de ligante de cada monômero de receptor (*verde-água*). Cada domínio de ligação de ligante das subunidades de receptor, vistos aqui em uma visão lateral, é composto por dois subdomínios. (Os dois *domínios verdes* estão um acima do outro nessa vista.) A dimerização do receptor ocorre

apenas se as duas moléculas ligantes de FGF estão ligadas, por sua vez, a uma molécula comum de heparina (*figura em bastão*), sendo esta um componente de glicosaminoglicano da matriz extracelular. (C) No caso de EGF-R, moléculas de fator de crescimento tumoral α (TGF- α), um dos ligantes alternativos desse receptor, ligam-se individualmente (*verde, esquerda; púrpura, direita*) às "porções laterais" de cada par de subunidades de receptor (*amarelo-escuro, rosa-escuro*). Conforme visto de uma visão superior da membrana plasmática, monômeros de receptor respondem à ligação de um ligante expondo domínios que medeiam sua dimerização. Assim, cada molécula de fator de crescimento é removida da região do monômero de receptor que está diretamente envolvida na dimerização. (A, de C. Wiesmann et al., *Cell* 91:695-704, 1997; B, de A. Plotnikov et al., *Cell* 98:641:650, 1999; C, de T. P. J. Garret et al., *Cell* 110:763-773, 2002.)

Uma vasta gama de alterações estruturais também pode ocasionar a dimerização do receptor independente do ligante, na ausência da superexpressão do receptor. Isso pode ser realizado por uma versão mutante do receptor HER2/ErbB2/Neu, um primo do receptor EGF que é encontrado em certos tumores de ratos. A exposição de ratas grávidas ao agente mutagênico etilnitrosúria (ENU) resulta no nascimento de filhotes que freqüentemente sucumbem a tumores neuroectodermas 3 a 6 meses depois. Os tumores quase que invariavelmente carregam uma mutação pontual na sequência que especifica o domínio transmembrana desse receptor (veja a Figura 5.12). A substituição de um resíduo de valina por um de ácido glutâmico favorece a dimerização constitutiva de dois receptores, mesmo na ausência de ligação de ligante, criando uma oncoproteína potente.

Como HER2/ErbB2/Neu, os receptores EGF e FGF podem ser afetados por mutações pontuais ou pequenas deleções que originam receptores constitutivamente ativos; as mutações

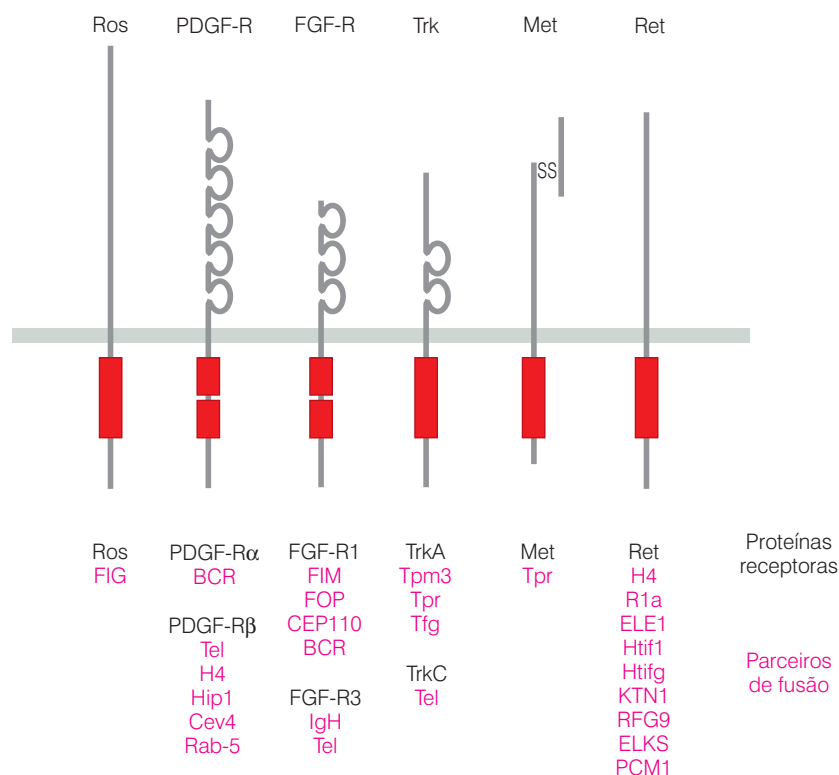


Figura 5.17 Fusão de genes causa a dimerização constitutiva de receptores. Em um grande número de tumores malignos, a dimerização do receptor ocorre quando os genes que codificam receptores de fatores de crescimento (*porção preta*) fusionam-se a genes não-relacionados que especificam proteínas que normalmente dimerizam-se ou formam oligômeros de ordem elevada (*porção vermelha*). Como consequência, as porções de receptor dessas proteínas de fusão híbridas (normalmente seus ectodomínios) são unidas pelas proteínas oligomerizantes às quais elas se uniram. Aqui, estão listados exemplos de tais mutantes, receptores fusionados encontrados em tumores humanos; em alguns casos, um dado receptor pode ser encontrado fusionado a múltiplas proteínas oligomerizantes alternativas. (Cortesia de A. Charest.)

somáticas correspondentes alteram os domínios citoplasmáticos desses receptores, perturbando os domínios que regulam as tirosina cinases associadas ao receptor. Em uma série de cânceres pulmonares de células não-pequenas, menos de 10% foram identificados como possuidores de receptores mutantes de EGF, os quais se mostraram particularmente responsivos a drogas terapêuticas direcionadas contra a molécula de receptor, como veremos na Seção 16.2. Receptores estruturalmente alterados foram descobertos como bastante comuns em carcinomas de bexiga: no mínimo 60% desses tumores são possuidores de versões significativamente alteradas do receptor FGF-3. O mecanismo preciso pelo qual versões truncadas, mutantes, do receptor EGF que não possuem ectodomínios tornam-se constitutivamente ativadas (veja a Figura 5.11) é pouco compreendido.

Outros tipos de alterações genéticas de receptores de tirosina cinase também podem originar oncoproteínas. Por exemplo, Met, cujas funções como receptor para fator de crescimento de hepatócitos (HGF), e TrkA, que atua como o receptor para o fator de crescimento neuronal (NGF), foram identificados como convertidos em oncoproteínas em alguns tumores como consequência de eventos de fusão gênica. Tais fusões resultaram em seqüências truncadas codificando os ectodomínios desses receptores e uma fusão das porções remanescentes desses receptores com outras proteínas que em geral formam dímeros ou oligômeros. Isso resulta em uma dimerização constitutiva, independente de ligante, desses receptores, explicando os poderes oncogênicos dessas proteínas fusionadas. Outras mudanças bruscas na estrutura do receptor também podem encorajar a ativação independente de ligante em diversos tipos celulares (Barra lateral 5.7).

Ainda que tenhamos dado grande ênfase à dimerização de receptores, esta representa apenas uma das modificações moleculares que moléculas de receptores de tirosina cinase podem sofrer após ligarem-se a seus ligantes. Existem evidências crescentes de que, junto a essa dimerização, o ectodomínio de ligação do ligante sofre algum tipo de rotação ou mudança estereoquímica, e que esta é transmitida através da membrana plasmática para os domínios de cinase citoplasmáticos dos receptores de tirosina cinase, que, por sua vez, movem-se para novas configurações que favorecem a transfosforilação. De fato, em alguns receptores de tirosina cinase, a dimerização constitutiva pode existir mesmo sem a ligação de um ligante, e o ligante age apenas para causar uma rotação

Barra lateral 5.7 Formas mutantes de um único receptor tirosina cinase podem desempenhar um papel causal em muitos tipos diferentes de câncer A proteína Kit foi originalmente descoberta como uma oncoproteína codificada por um retrovírus do sarcoma felino. O proto-oncogene *kit* codifica um receptor tirosina cinase cujo ligante é o fator de células-tronco (SCF), um fator de crescimento importante para a estimulação da formação de vários tipos de células no sangue (o processo de **hematopoiese**), bem como para o desenvolvimento de uma variedade de tipos celulares não-hematopoiéticos, incluindo melanócitos e as células mediadoras de mobilidade intestinal. Formas mutantes do receptor Kit, as quais são ativadas constitutivamente de forma independente de ligante, são encontradas em um arranjo diverso de malignidades. Em muitas leucemias de cães, receptores Kit mutantes carregando substituições de aminoácidos nos resíduos **justamembrana** citoplasmáticos – aqueles próximos ao domínio transmembrana – são comuns.

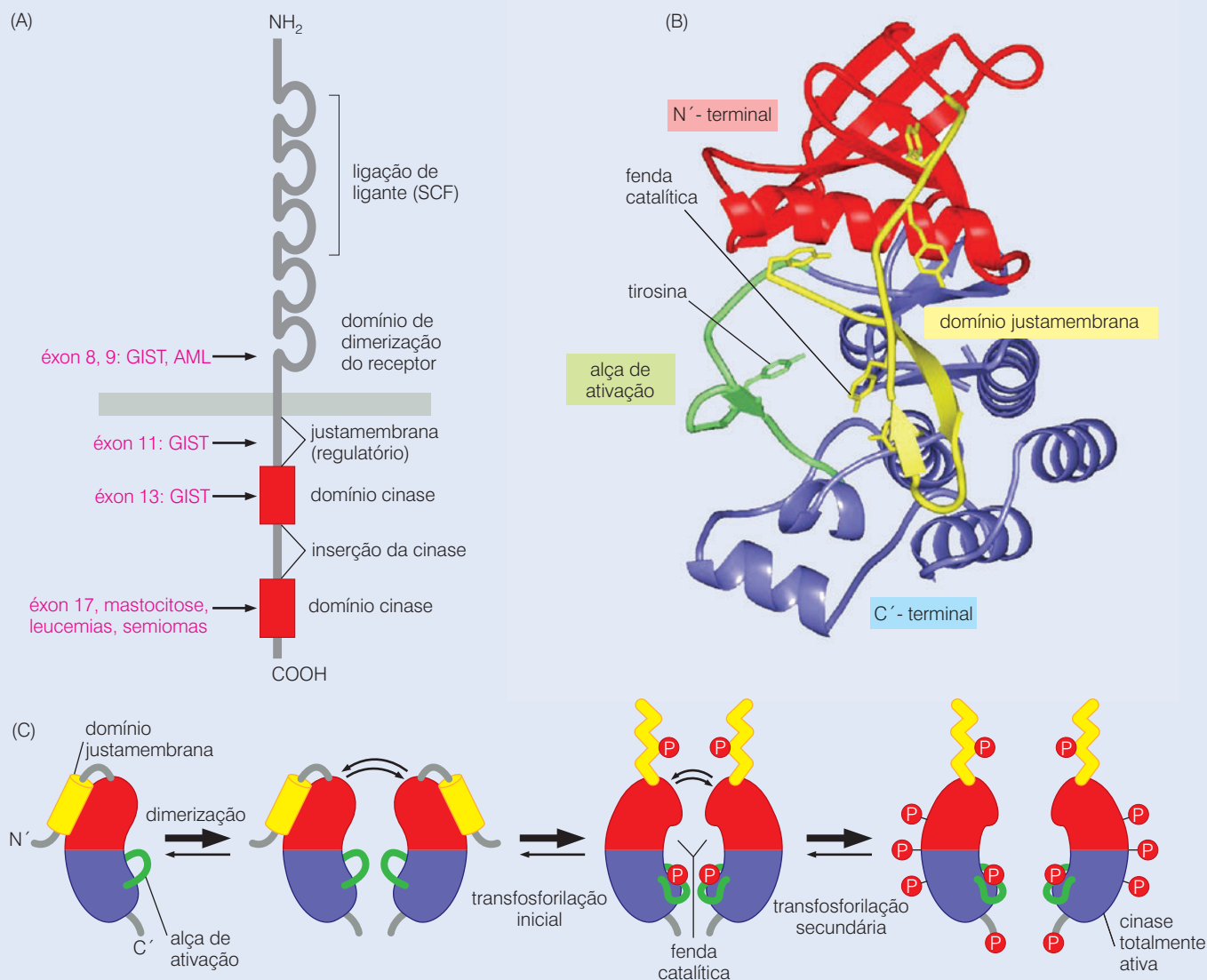
As células marca-passo do intestino, as quais controlam as contrações peristálticas dos músculos lisos desse órgão, também baseiam-se

no receptor Kit para seu desenvolvimento apropriado e estão ausentes se o gene *kit* é inativado na linhagem germinativa (e assim em todas as células) de um camundongo. Em tumores do estroma gastrointestinal (GISTs) de humanos, que parecem surgir dessas mesmas células, substituições de aminoácidos justamembrana similares àquelas vistas em leucemias de cães são normalmente observadas. Análises da estrutura do receptor Kit e de receptores de tirosina cinase relacionados indicam que o domínio justamembrana do receptor Kit desempenha um papel **inibitório** na regulação do receptor e que sua habilidade em suprimir a ativação do receptor é comprometida por substituições de aminoácidos e deleções neste domínio que são comumente vistos em GISTs (Figura 5.18). Em um grupo de pacientes GIST, aqueles cujos tumores carregavam mutações sutis (sentido trocado) afetando o éxon 11 do gene *kit* estavam todos vivos quatro anos após o diagnóstico inicial e tratamento, enquanto apenas metade daqueles cujos GISTs carregavam deleções do éxon inteiro estavam vivos no mesmo tempo.

Figura 5.18 Múltiplas alterações estruturais alteram a ativação do receptor Kit (A) Conforme apresentado aqui, o receptor Kit pode ser encontrado constitutivamente ativo, uma forma mutante encontrada em muitos tumores humanos (*letras vermelhas*). (B) A estrutura do domínio citoplasmático do receptor Flt-3 (determinada por cristalografia de raios X), que é proximamente relacionado ao Kit, está mostrada aqui como uma estrutura em fita. Como quase todas as proteínas cinases, esta é composta de uma porção N-terminal (*vermelho*) e uma porção C-terminal (*azul*), com uma fenda catalítica entre elas. A fenda catalítica normalmente está obstruída tanto por uma “alça de ativação” (*verde*) quanto por um domínio justamembrana (*amarelo*). Note o resíduo de tirosina da alça de ativação, cuja fosforilação retira a alça do caminho, permitindo o acesso dos substratos à fenda catalítica. (C) O receptor Kit, encontrado mutado em praticamente todos os tumores de estroma gastrintestinais (GISTs), freqüentemente carrega alterações que afetam o domínio justamembrana (JM), mostrado aqui como um cilindro amarelo colocado acima da porção N-terminal da tirosina cinase com dois lóbulos (*visão lateral, membrana plasmática está acima [não-mostrado]*). Ligação do ligante ao receptor Kit resulta inicialmente na transfosforilação de resíduos de tirosina no domínio JM, que causa sua dissociação da porção N-terminal; a estrutura fosforilada resultante (*zigzague amarelo*) está mostrada aqui como posicionada acima do domínio cinase, ou seja, fora do caminho. Após a ocorrência desses eventos, a transfosforilação de um resíduo-chave de tirosina na alça de ativação (*verde*), que normalmente obstrui a fenda catalítica (veja o painel B), também contribui para a ativação da função de cinase. Receptores Kit mutantes que possuem domínios JM defectivos são, dessa forma, parcialmente ativados mesmo na ausência da ligação com o ligante. (A, cortesia de D. Emerson; B, de J. Griffith, *J. Mol. Cell* 13:169-178, 2004; C, de P. M. Chan et al., *Mol. Cell Biol.* 23:3067-3078, 2003.)

concorrente tanto nos ectodomínios quanto nos domínios citoplasmáticos das moléculas de receptor que facilitam a sinalização pelos seus domínios de cinase.

O seqüenciamento do genoma humano revelou o repertório completo de receptores da tirosina cinase que possivelmente são expressos em tecidos humanos. De cerca de 22 mil genes em nosso genoma, no mínimo 58 codificam proteínas possuidoras da estrutura geral dos receptores EGF e PDGF, ou seja, um ectodomínio de ligação de ligante, um domínio transmembrana e um domínio citoplasmático de tirosina cinase. Esses receptores foram agrupados em subclasses, de acordo com suas similaridades estruturais (veja a Figura 5.10). Até o presente momento, apenas um pequeno número desses receptores foi implicado como agente que contribui para a formação de cânceres humanos. É provável que o envolvimento de outros receptores dessa classe em cânceres humanos seja demonstrado futuramente. Alelos mutantes de certos genes de receptores de tirosina cinases podem ser significativamente transmitidos para a linhagem celular germinativa. Isso pode explicar a origem de uma série de síndromes familiares de câncer, nas quais os membros afetados apresentam riscos aumentados de contraírem certos tipos de cânceres (Barra lateral 5.8).



5.7 Também outros receptores permitem com que células de mamíferos comuniquem-se com seu ambiente

Por volta de 1980, diversos tipos distintos de receptores de metazoários haviam sido descobertos. A partir de então, tornou-se claro que os receptores tirosina cinase representavam apenas uma classe de receptores dentre um grupo muito maior de receptores estruturalmente diversos, todos projetados para permitir que as células sentissem o estado bioquímico de seus arredores. Como no caso dos receptores de tirosina cinase, cada um dos tipos de receptor é especializado para detectar a presença de um ligante extracelular específico, ou grupos relacionados de ligantes, e responder a esse encontro com a transdução de sinais para o citoplasma.

Uma classe de receptores, que é especialmente importante na recepção de sinais controladores do desenvolvimento de vários tipos celulares hematopoiéticos, também utiliza tirosina cinases. Nesse caso, no entanto, as enzimas responsivas, chamadas Jaks (Janus cinases), são polipeptídeos separados que se associam aos domínios citoplasmáticos desses receptores por meio de ligações não-covalentes. Nesse grupo, inclui-se o receptor da eritropoetina (EPO),

Barra lateral 5.8 Genes mutados de receptores podem ser transmitidos para linhagens germinativas humanas O gene *ret* codifica um receptor de tirosina cinase que pode ser encontrado frequentemente em formas mutantes de carcinomas papilares de tireóide, especialmente nos que foram induzidos por exposição negligente da glândula da tireóide a raios X em exames clínicos. Nesses tumores, o gene *ret*, na maioria das vezes, encontra-se fusionado a um ou a diversos outros genes, como consequência de uma translocação cromossômica (veja a Figura 5.17). O resultado é a ativação constitutiva da proteína fusionada Ret de forma independente de ligante. Alelos mais bruscamente alterados podem ser transmitidos para linhagens celulares germinativas, em que podem causar síndromes de cânceres herdados conhecidas, como a neoplasia endócrina múltipla (MEN) dos tipos 2A e 2B e o carcinoma medular de tireóide familiar.

A MEN é uma síndrome relativamente incomum, encontrada em uma em cada 30 mil pessoas da população geral. No tipo 2A de MEN, a tireóide é o principal local do câncer, e praticamente todos os pacientes possuem carcinomas papilares de tireóide. Além disso, locais secundários de cânceres podem ser encontrados nas glândulas adrenal (ocasionando feocromocitomas) e paratireóide (causando hiperplasias ou adenomas). A doença proximamente relacionada MEN tipo 2B manifesta-se como um risco aumentado de tumores de tireóide e na glândula adrenal, além das células dos glânglios nervosos no trato intestinal. Casos de MEN 2A normalmente iniciam com uma mutação pontual herdada que causa a substituição de um resíduo de cisteína no domínio extracelular de tirosina cinase do receptor Ret. Casos de MEN 2B são causados por uma substituição no domínio tirosina cinase desse receptor.

O câncer hereditário nas papilas renais deve-se a alelos mutantes herdados no gene *met*, que codifica o receptor para o fator de crescimento de hepatócito (HGF). Esses alelos mutantes de linhagens germinativas de *met* frequentemente carregam mutações que causam substituições de aminoácidos no domínio tirosina cinase de Met, resultando na ativação independente de ligante e, de forma constitutiva, do receptor.

Membros de uma família japonesa (Figura 5.19) foram identificados como transmissores de um alelo mutante do receptor Kit para sua linhagem germinativa. Como as formas somáticas mutantes de *kit* (veja a Barra lateral 5.7), os alelos mutantes da linhagem germinativa possuem uma mutação que afeta o domínio justamembrana do receptor Kit, ocasionando tumores de estroma gastrointestinal (GISTs). Quando essa mutação é introduzida em uma das duas cópias do gene *kit* da linhagem germinativa de camundongo, indivíduos que herdam esse alelo mutante desenvolvem tumores indistinguíveis dos GISTs verificados em humanos.

As síndromes de cânceres descritas aqui são, em sua maioria, pouco usuais, já que grande parte de tais síndromes envolve mutações de

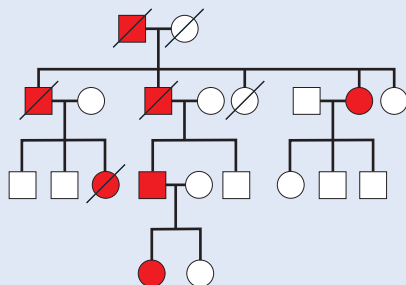


Figura 5.19 Tumores de estroma gastrointestinal (GISTs) Tumores de estroma gastrointestinal surgem das células mesenquimais marca-passo do trato gastrointestinal inferior, contrastando com os carcinomas de cólon, muito mais frequentes, que derivam da camada de células epiteliais que circunda o lúmen do intestino. No caso da genealogia mostrada aqui, um alelo codificando um receptor tirosina cinase Kit mutante, constitutivamente ativo, foi carregado por quatro gerações, afetando-as com GISTs e/ou obstruções intestinais. A transmissão desse alelo mutante, que possui uma deleção de um único resíduo de aminoácido no domínio justamembrana da proteína receptora (veja a Figura 5.18), por tantas gerações indica que a sua expressão fenotípica em uma linhagem germinativa foi frequentemente adiada até relativamente tarde na infância de diversas crianças. Indivíduos afetados (*vermelho*); homens (*quadrados*); mulheres (*círculos*); mortos (*riscados*). (De T. Nishida et al., *Nat. Genet.* 19:323-324, 1998.)

genes em linhagens germinativas que resultam, em nível celular, na formação de alelos recessivos inativos. Dentre esses alelos, estão incluídos os de genes supressores de tumor, a serem discutidos no Capítulo 7, e os genes de reparo de DNA, descritos no Capítulo 12. Parece provável que, de modo geral, oncogenes mutantes constitutivamente ativos não podem ser tolerados em linhagens germinativas, já que eles atuam como alelos dominantes nas células, sendo, portanto, altamente prejudiciais para o desenvolvimento embrionário normal. Alelos recessivos presentes em uma única cópia na linhagem germinativa, no entanto, podem ser tolerados, já que sua presença nas células torna-se aparente apenas quando o alelo dominante tipo selvagem é perdido. Como essa perda é pouco frequente, a expressão do fenótipo induzido por câncer é adiado até bastante tarde no desenvolvimento.

Os alelos oncogênicos dominantes dos genes de receptores de tirosina cinase listados anteriormente parecem ser compatíveis com um desenvolvimento normal, já que sua expressão (no caso dos genes *ret* e *kit*) está limitada a um pequeno grupo de tecidos, podendo ser até adiada durante a embriogênese, permitindo o desenvolvimento normal do embrião, sem os efeitos deletérios desses alelos promotores de crescimento.

Essa lógica foi abalada pela caracterização genética de uma síndrome de câncer familiar rara identificada em 2005: ao contrário do que havia sido pré-concebido, alelos mutantes, ativados, do proto-oncogene *H-ras* presentes em um zigoto não eram incompatíveis com um desenvolvimento humano relativamente normal. Indivíduos herdeiros desse alelo são afetados pela síndrome de Costello, que está associada a um retardo mental, alto peso ao nascer, **cardiomiopatia** (defeitos patológicos no músculo cardíaco) e uma tendência para desenvolver tumores; juntas, essas patologias impediram que esses indivíduos atingissem a idade adulta. (Isso explica porque os 12 casos descritos representavam mutações *de novo*, ou seja, mutações novas que surgiram durante a formação do óvulo, em vez de herdadas de um parente afetado.)

Surpreendentemente, muitos órgãos desses indivíduos desenvolvem-se de modo normal, apesar da presença de um alelo muito penetrante de um oncogene ativado *H-ras* (veja a Seção 4.4) em todas as suas células.

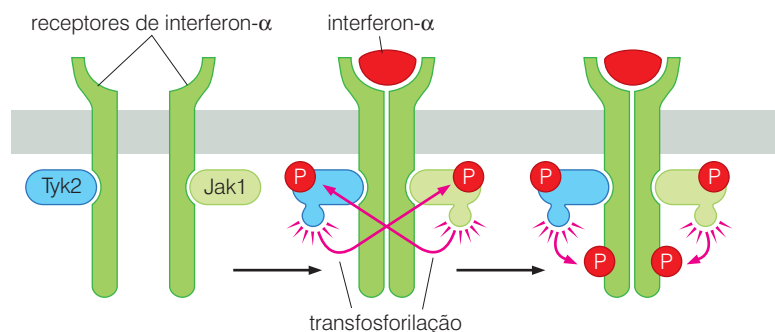


Figura 5.20 Estrutura dos receptores de citocinas O receptor de interferon (IFN-R, verde-escuro), como o receptor de eritropoetina e trombopoetina, carrega tirosina cinases ligadas não covalentemente (TKs) da família Jak (nesse caso, Tyk2 e Jak1). Após a ligação do ligante (nesse caso, o interferon- α), as TKs transfosforilam-se, ativando-se uma a outra. Subseqüentemente, elas fosforilam as caudas C-terminal das subunidades de receptor, posicionando o receptor em uma configuração ativa de sinalização, de forma similar às tirosina cinases descritas na Seção 5.6.

que, conforme mencionado anteriormente, regula o desenvolvimento de eritrócitos (células vermelhas do sangue), e o receptor da **trombopoetina** (TPO), que controla o desenvolvimento de precursores das plaquetas sangüíneas, os chamados **megacariócitos**. Os receptores para importantes interferons imunes reguladores também são membros dessa classe. Quando moléculas de receptor dessa classe dimerizam em resposta à ligação do ligante, as Jaks associadas fosforilam e ativam-se umas às outras (Figura 5.20); as Jaks ativadas então prosseguem para fosforilar as porções C-terminal de moléculas de receptor, criando assim receptores ativados para emitirem sinais, de forma semelhante aos receptores de tirosina cinase descritos anteriormente. Retornaremos aos detalhes da sinalização de Jak no próximo capítulo.

O fator de crescimento transformante β (TGF- β) e ligantes relacionados possuem receptores que são superficialmente similares aos receptores de tirosina cinase, já que ambos possuem um domínio extracelular de ligação de ligante, um domínio transmembrana e um domínio cinase citoplasmático. No entanto, eles atuam invariavelmente como heterodímeros, como os complexos tipo I e tipo II dos receptores TGF- β (Figura 5.21). Eles também diferem por seus domínios cinase fosforilarem resíduos de serina e treonina, em vez de tirosina. Os TGF- β s desempenham papéis centrais na patogênese do câncer, já que suprimem a proliferação de células epiteliais normais e promovem a aquisição de propriedades invasivas por células já transformadas. Após a ligação do ligante, a subunidade tipo II do receptor, que possui uma serina/treonina cinase constitutivamente ativa, é aproximada da subunidade tipo I do receptor TGF- β , para que ele possa fosforilá-la. A cinase pertencente ao receptor tipo I, como consequência, torna-se ativada, prosseguindo para fosforilar proteínas citoplasmáticas que migram para o núcleo da célula, onde desencadeiam a expressão de certos genes-alvo (veja a Figura 5.21). (Uma série de fatores relacionados a TGF- β , incluindo a activina e proteínas de morfogênese de osso [ou BMPs], utilizam receptores similares para sinalizarem; eles não serão discutidas a fundo aqui, já que seu papel no desenvolvimento de câncer ainda não foi documentado.) Adiaremos uma discussão mais detalhada do sistema de sinalização de TGF- β até o Capítulo 8.

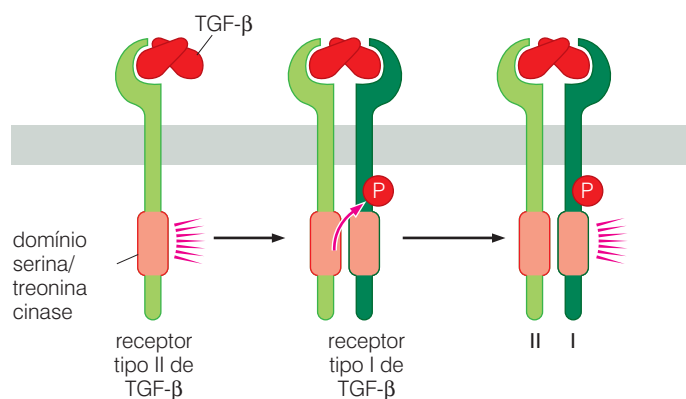
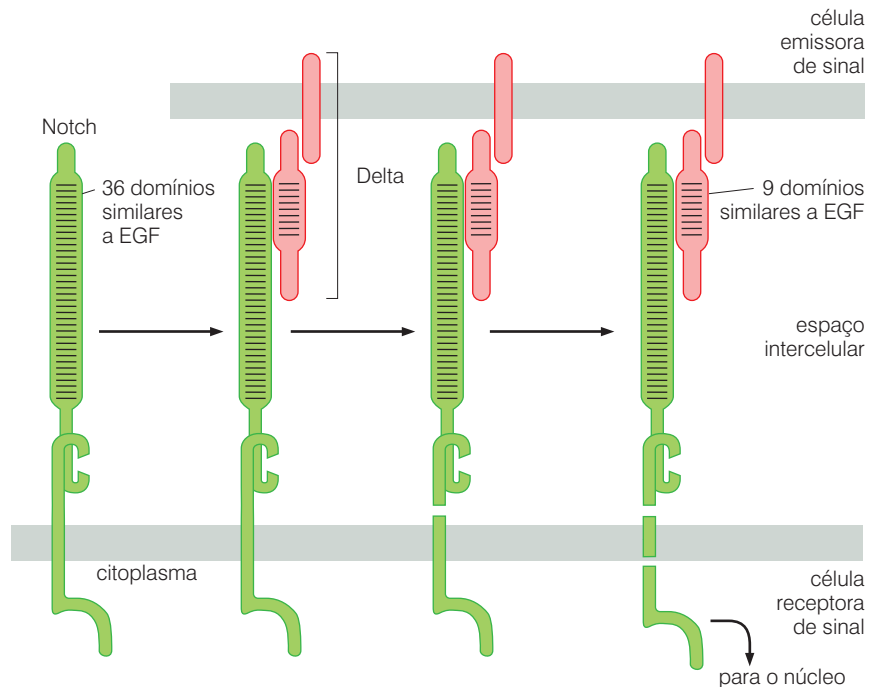


Figura 5.21 Estrutura do receptor TGF- β A estrutura do receptor TGF- β é superficialmente similar à dos receptores de tirosina cinase (RTKs), já que ambos os tipos de receptor sinalizam por meio de domínios citoplasmáticos de cinase. No entanto, os domínios cinase dos receptores TGF- β fosforilam especificamente resíduos de serina e treonina, em vez de resíduos de tirosina. Após o receptor tipo II (TGF- β RII) contatar o receptor tipo I (TGF- β RI) por meio da ligação do ligante TGF- β , ele fosforila e ativa a cinase carregada pelo receptor tipo I, por sua vez, emite sinais fosforilando alguns substratos citoplasmáticos.

Figura 5.22 Estrutura do receptor Notch O receptor Notch (verde) parece possuir um tipo bastante primitivo de sinalização. Após ter se ligado ao ligante (ou seja, NotchL ou, conforme mostrado aqui, Delta, rosa), que foi apresentado na superfície da membrana de uma célula adjacente, Notch sofre duas clivagens proteolíticas sucessivas, e o fragmento C-terminal resultante é liberado, permitindo sua migração para o núcleo da célula, onde ele altera a expressão de certos genes.



Uma forma bastante primitiva de sistema de sinalização transmembrana é o receptor Notch (chamado simplesmente de Notch) e seus múltiplos ligantes alternativos (NotchL, Delta, Jagged; Figura 5.22). Após a ligação do ligante, Notch é clivado sucessivamente por duas proteases. Um dos fragmentos proteolíticos Notch resultantes, derivado do seu domínio citoplasmático, migra então para o núcleo, onde atua como parte de um grupo de fatores de transcrição que ativam a expressão de uma série de genes de resposta. A via de sinalização de Notch parece contribuir para a transformação celular mediada por Ras e está envolvida em

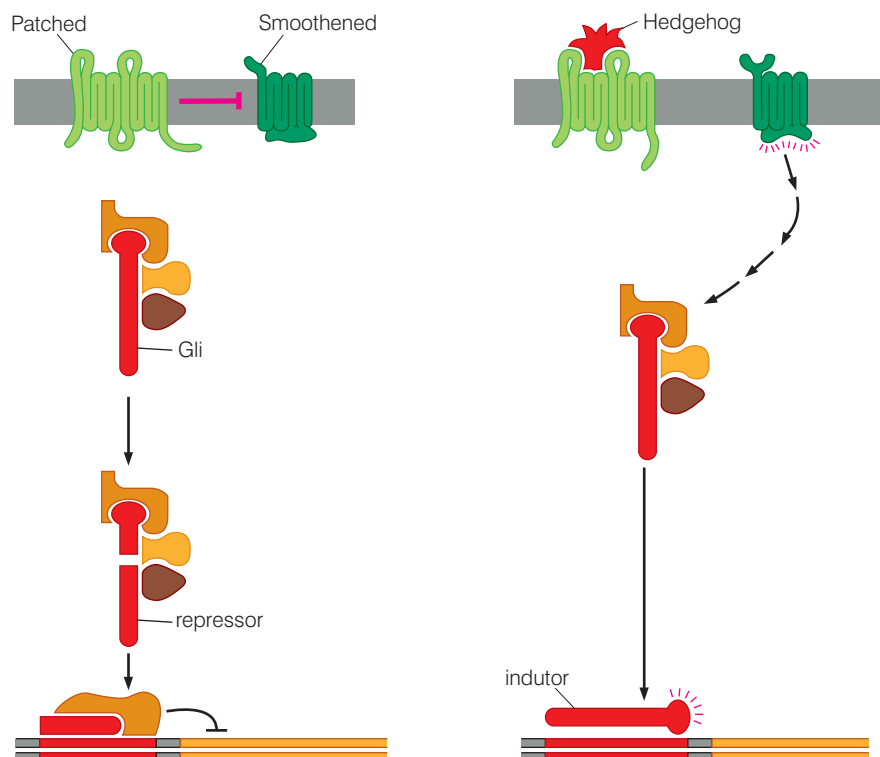


Figura 5.23 O sistema de sinalização de Patched-Smoothed A via de Hedgehog utiliza seu sistema próprio e único de sinalização. Normalmente, Smoothed, um receptor de superfície de membrana com sete segmentos (verde-escuro), é funcionalmente inerte, sendo inibido por Patched (verde-claro), que contém 12 domínios que trespassam a membrana (esquerda, acima). Nessas condições, Gli (vermelho) é clivado em uma proteína que se move para o núcleo, onde ela opera como um repressor da transcrição (esquerda, abaixo). No entanto, quando o ligante Hedgehog (vermelho, direita acima) liga-se a Patched, ele libera seu poder inibitório para Smoothed, que prossegue, de forma desconhecida, para prevenir a clivagem de Gli, permitindo que Gli se mova até o núcleo, onde ela pode agir como um indutor da transcrição (direita, abaixo).

Barra lateral 5.9 Como fatores de crescimento transitam no espaço intercelular? As discussões sobre fatores de crescimento neste capítulo implicam que essas proteínas, uma vez secretadas por células, se difundem livremente no fluido intracelular até atingir seus alvos pretendidos, ou seja, outras células que apresentam receptores celulares correspondentes. Na verdade, muitas moléculas de fatores de crescimento, talvez a grande maioria delas, ligam-se a componentes da matriz extracelu-

lar (ECM) logo após sua liberação pelas células que as sintetizaram. A ECM é uma rede complexa de glicoproteínas e **proteoglicanas** secretadas, que preenche quase todo o espaço intercelular e confere rigidez aos tecidos; em breve leremos sobre a ECM em grande detalhe (Seção 5.8).

Muitos tipos de fatores de crescimento secretados parecem decorar a ECM, assim como enfeites são utilizados para embelezar uma árvore de Natal. Tais fatores de crescimento podem permanecer em uma forma inerte na ECM

por grandes períodos, sendo depois liberados da ECM e convertidos em fatores solúveis e ativados. As células que liberam esses fatores retidos em sua ECM comportam-se como animais que procuram arbustos à procura de alimento. Essas células buscadoras normalmente utilizam proteases secretadas para mobilizar os fatores de crescimento. Elas também podem apresentar receptores que lhes permitem responder a fatores de crescimento que elas mesmas mobilizaram.

diversos processos morfogênicos. Formas ativas e mutantes de Notch, que são ativadas de forma independente de ligante, foram identificadas em leucemias de células T de adultos.

Outro receptor, ainda, chamado Patched, é construído a partir de múltiplos domínios transmembrana que se movem na membrana plasmática (Figura 5.23). Quando os ligantes de Patched – proteínas da classe Hedgehog (Hh) – ligam-se a Patched (Ptc), este se afasta de uma segunda proteína de membrana chamada Smoothened (Smo). Smo então sinaliza para um complexo citoplasmático que libera um fator de transcrição, que, por sua vez, é translocado para o núcleo, onde ativa os genes-alvo de Hedgehog. Alelos mutantes tanto de *Ptc* quanto de *Smo* foram encontrados nas células basais de carcinomas da pele, e alelos mutantes de *Ptc* foram encontrados em diversos meduloblastomas; retornaremos a essa classe de tumores no Capítulo 16.

Os fatores Wnt representam, ainda, outro sistema independente de sinalização. Conforme descrito anteriormente, sua descoberta deve-se a uma *Drosophila* mutante, chamada *Wingless*, e a um gene relacionado, chamado *int-1* de camundongos; este último foi descoberto graças à mutagênese insercional de um vírus de tumor mamário de camundongo (veja a Barra lateral 3.8). Essas proteínas Wnt estão ligadas fortemente à matriz extracelular (ECM) e, por meio de uma cauda lipídica, a membranas celulares, não parecendo ser livremente

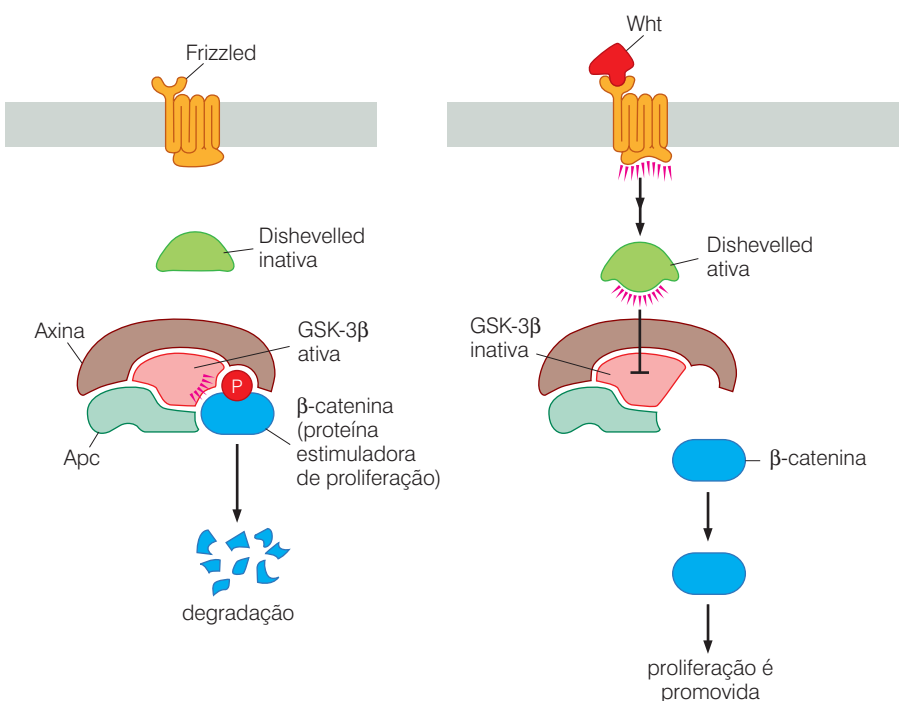
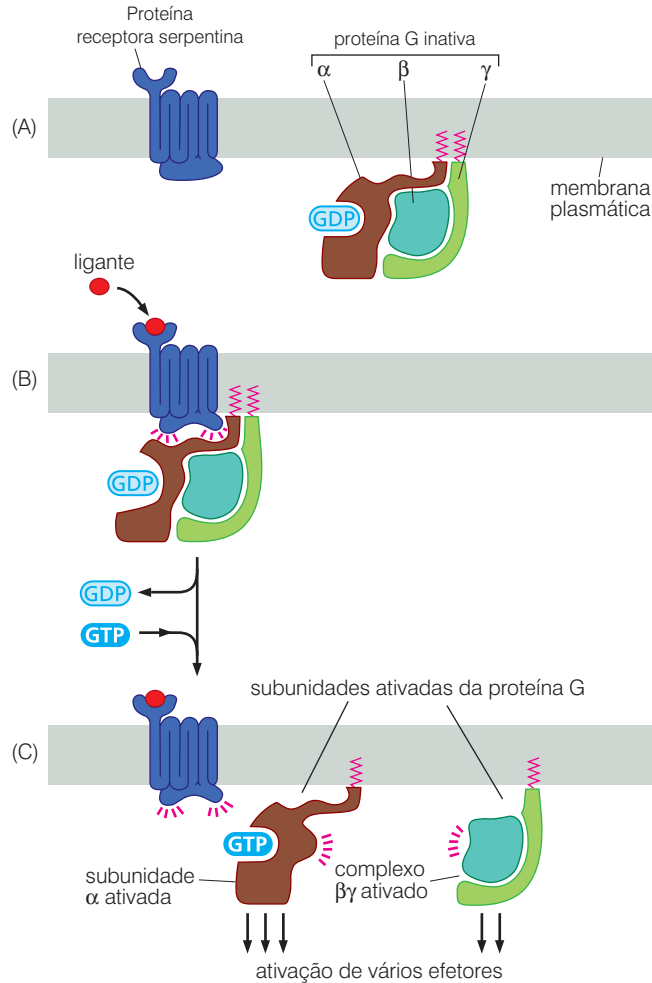


Figura 5.24 Sinalização pelos receptores Frizzled. Receptores das proteínas Wnt são membros da família Frizzled (Frz) de proteínas transmembrana. Na ausência de ligação de ligante (*esquerda*), um complexo de Axina (*marrom*) e Apc (*verde-claro*) permite que a glicogênio sintase cinase 3β (GSK-3β, *rosa*) fosforile a β-catenina (*azul*). Isso marca a β-catenina para uma rápida destruição por proteólise. No entanto, quando um ligante Wnt liga-se ao receptor Frizzled (*direita*), o receptor Frizzled ativado resultante, agindo via proteína Dishevelled (*verde-claro*), inibe a GSK-3β. Com isso a β-catenina é poupada, podendo acumular-se e promover a proliferação celular.

Figura 5.25 Sinalização pelos receptores

serpentina (A) Os receptores que trespassam a membrana sete vezes (serpentina) (*esquerda*) são associados a proteínas G heterotriméricas, que são compostas por subunidades α , β e γ (*direita*). (B) Uma vez que um receptor tenha ligado o seu ligante cognato (*vermelho*), ele estimula a subunidade α da proteína G a liberar seu GDP (difosfato de guanosina) e ligar, em vez deste, um GTP (trifosfato de guanosina) (*azul-claro*). (C) Como parte dessa resposta, a subunidade α se dissocia do par $\beta+\gamma$. Agora, a subunidade α (*marrom*) e, independentemente, o complexo $\beta+\gamma$ (*azul, verde-claro*) podem prosseguir para regular enzimas que evoquem uma série de respostas *downstream*. A sinalização é interrompida quando a subunidade α hidroliza seu GTP ligado, fazendo com que ela se reassocie ao complexo $\beta+\gamma$ (*não-mostrado*).



difundíveis como outros fatores de crescimento discutidos anteriormente (veja a Barra lateral 5.9). Fatores de crescimento da classe Wnt ativam receptores da família Frizzled (Frz), que, da mesma forma que Patched, são receptores complexos que se movimentam para frente e para trás múltiplas vezes na membrana plasmática (Figura 5.24). Sem a sinalização por Wnt, a enzima citoplasmática glicogênio sintase cinase 3β (GSK- 3β) fosforila diversas proteínas-chave para a promoção de proliferação celular, incluindo β -catenina, marcando-as para a destruição. No entanto, a ligação de Wnts a receptores Frizzled ativa uma cascata de passos que interrompem a ativação de GSK- 3β , permitindo que essas proteínas escapem da degradação e promovam proliferação celular. Essa via também possui um papel crítico na patogênese do câncer, o qual discutiremos em grande detalhe em diversos dos capítulos que seguem.

Uma busca recente no genoma humano indica que ele codifica, juntamente com os receptores de tirosina cinase, 11 receptores similares a TGF- β , quatro receptores Notch, um ou dois receptores Patched e dez receptores Frizzled. Em um número muito maior do que esses, está uma classe de receptores que, como as proteínas Patched e Frizzled, trespassam de um lado a outro a membrana plasmática. Como as proteínas Frizzled, essa classe de receptores, também chamada de receptores “serpentina” devido a sua configuração semelhante a uma serpente, atravessam a membrana plasmática precisamente sete vezes (Figura 5.25). Após a ligação de um ligante, elas sinalizam por meio de sua capacidade de ativar proteínas G (abreviação para proteínas ligadoras de guanina) no citoplasma, sendo frequentemente chamadas de receptores acoplados à proteína G (GPCRs). Existem mais de mil tipos distintos de GPCRs codificados pelo genoma de mamíferos.

Esses receptores versáteis estão envolvidos em funções tão diversas quanto o olfato no nariz, o gosto na boca, a detecção de fótons na retina e a detecção de neurotransmissores no cérebro. Juntos, os genes que codificam esses receptores representam quase 5% do valor total de genes presentes no genoma humano.

As proteínas G estimuladas por GPCRs agem como tomadas binárias, alternando estados de ligação a GDP e GTP. Essas proteínas G são estruturalmente complexas; elas são heterotrímeros compostos de subunidades α , β e γ . Conforme indicado na Figura 5.25, uma vez que GPCR liga seu ligante, uma mudança de configuração pouco entendida do receptor faz com que ele permita a liberação de GDP pela subunidade α da proteína G e a posterior ligação de um GTP. A subunidade α então se dissocia de seus parceiros $\beta + \gamma$ e prossegue para interagir com outras proteínas **efetoras**, que transmitem sinais para o interior da célula; o complexo $\beta + \gamma$ também pode interagir com seus próprios receptores *downstream*. Finalmente, a subunidade α se “desliga”, hidrolizando o GTP ligado a ela (convertendo-o em GDP) e associando-se novamente a seus parceiros $\beta + \gamma$. Estes complexos heterotrímicos, então, retornam a seu estado inativo, que não está sinalizando, esperando novamente os sinais vindos do GPCR. Ainda que em grande número, esses receptores foram implicados, até agora, na patogênese de um pequeno grupo de cânceres humanos (a ser descrito no Capítulo 6).

5.8 Receptores de integrina sentem a associação entre a célula e sua matriz extracelular

A biologia de células normais e transformadas nos fornece pistas de ainda outro tipo de receptor de superfície celular, um receptor dedicado a sentir uma classe diferente de moléculas no espaço extracelular. Lembremo-nos que um atributo importante de células transformadas é a sua capacidade de crescer de modo independente de ancoragem, isto é, proliferar sem aderir a um substrato sólido, como a superfície de uma placa de Petri (veja a Seção 3.5). Esse comportamento contrasta com o de células normais, que necessitam aderir a uma superfície para proliferar. De fato, na ausência de tal aderência, muitos tipos celulares normais irão ativar uma versão de seu programa de morte celular (**apoptose**), frequentemente chamado de **anoikis**. Esses processos de morte celular serão explorados no Capítulo 9.

Análises bioquímicas do substrato sólido ao qual as células aderem em uma placa de Petri revelaram que, na maior parte das vezes, as células não estão diretamente ancoradas à superfície de vidro ou plástico dessas placas. Em vez disso, elas estão ligadas a uma rede complexa de moléculas que se assemelha à matriz extracelular (ECM) normalmente encontrada nos espaços entre células na maioria dos tecidos. A ECM é composta por uma série de glicoproteínas, incluindo colágenos, lamininas, proteoglicanas e fibronectinas (Figura 5.26). Após serem introduzidas na placa de Petri, as células secretam componentes de ECM, que aderem ao vidro ou plástico; uma vez que a ECM foi construída dessa maneira, as células aderem a essa matriz. Conseqüentemente, a dependência de ancoragem reflete a necessidade que células normais possuem de estarem conectadas a componentes da ECM para sobreviver e proliferar.

A característica da dependência de ancoragem obviamente demonstra que as células são capazes de sentir se estão ou não corretamente aderidas à ECM. Conforme descoberto por volta de 1980, tal sensibilidade depende de receptores especializados, que informam as células acerca da extensão da fixação da célula à ECM e sobre a identidade de componentes moleculares específicos da ECM (como colágenos, lamininas, e fibronectinas) aos quais essa fixação ocorreu. A maior parte, senão toda, dessa sinalização é realizada por uma classe de receptores de superfície celular denominada **integrinas**. De fato, os componentes moleculares da ECM servem como ligantes de receptores de integrina. Ao mesmo tempo, as integrinas conferem estabilidade mecânica aos tecidos, fixando células ao ancoradouro formado pela ECM.

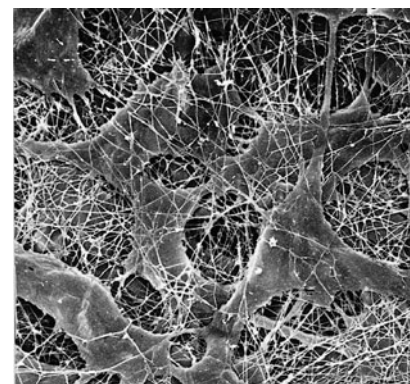


Figura 5.26 Matriz extracelular Esta micrografia eletrônica ilustra fibroblastos embebidos na matriz extracelular específica (ECM) presente na córnea (de rato). Muitos dos componentes dessa ECM, incluindo glicoproteínas, ácido hialurônico e proteoglicanas, foram removidos para destacar o seu componente principal – as fibras de colágeno. (De T. Nishida et al., *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 29:1887-1890, 1988.)

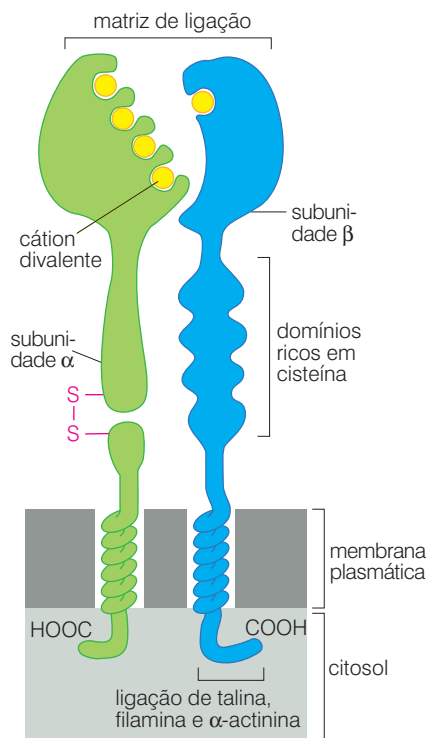


Figura 5.27 Estrutura das integrinas Moléculas de integrina funcionam como receptores heterodiméricos de superfície celular, cada um composto de uma subunidade α e uma subunidade β (verde, azul). O ectodomínio desses receptores liga-se a componentes específicos da matriz extracelular (ECM). Ao mesmo tempo, o domínio citoplasmático (principalmente o da subunidade β) está ligado, via proteínas intermediárias, ao citoesqueleto (principalmente às fibras de actina); além disso, os domínios citoplasmáticos podem atrair diversas proteínas transdutoras que se tornam ativas quando o ectodomínio liga-se a um ligante da ECM.

As integrinas são uma grande família de receptores transmembrana de superfície celular compostos por subunidades α e β . No mínimo dezoito subunidades α e oito subunidades β foram identificadas; juntas, 24 heterodímeros distintos são conhecidos. Os ectodomínios desses receptores ligam-se a componentes específicos da ECM (Figura 5.27). A Tabela 5.4 indica que cada heterodímero de integrina possui especificidade para a ligação de uma molécula específica da ECM ou de um pequeno grupo de componentes da ECM. A integrina bastante estudada $\alpha 5/\beta 1$, por exemplo, é o principal receptor de fibronectina, uma importante glicoproteína que compõe a ECM, encontrada em tecidos de vertebrados. As lamininas, que são moléculas maiores, multidomínios de ECM, têm sido descritas como ligadas a até 12 heterodímeros de integrinas.

Tendo ligado seus ligantes de ECM por meio de seus ectodomínios, as integrinas agrupam-se para formar *adesões focais* (Figura 5.28A). Esse agrupamento afeta a organização do citoesqueleto que sustenta a membrana plasmática, já que algumas integrinas estão direta ou indiretamente ligadas, via seus domínios citoplasmáticos, a importantes componentes do citoesqueleto, como actina, vinculina, talina e paxilina (Figura 5.28B). A formação de adesões focais pode também fazer com que os domínios citoplasmáticos de integrinas ativem vias de sinalização que evocam diversas respostas celulares, incluindo migração celular, proliferação e sobrevivência. Por exemplo, desencadeando a liberação de sinais antiapoptóticos, as integrinas reduzem sua probabilidade de anoikis. Essas funções de integrinas são críticas durante o desenvolvimento de tumores (Barra lateral 5.10).

As integrinas são ainda pouco usuais em outro aspecto. Normalmente, pensamos em receptores como transmitindo informação de fora da célula para o citoplasma. Com certeza as integrinas fazem isso. Porém, além disso, está claro que sinais originados no citoplasma são utilizados para controlar as afinidades de ligação de integrinas pelos seus ligantes da ECM. Tal sinalização “de dentro para fora” permite que a célula module sua associação com vários tipos de ECM ou com vários pontos de contato com uma ECM, rompendo contatos existentes e forjando novos. A modulação rápida dos contatos extracelulares permite que as células se liberem do microambiente de um tecido e movam-se para outro, além de atravessar uma camada de ECM *in vitro*. Fibroblastos em cultura que não possuem a cinase de adesão focal (FAK), uma das moléculas sinalizadoras que se associam aos domínios citoplasmáticos de integrinas, são incapazes de remodelar seus contatos focais e não possuem mobilidade, indicando que os sinais transduzidos pela FAK citoplasmática são importantes na reconfiguração do citoesqueleto – a estrutura que permite à célula mudar sua forma e se mover. Mais tarde, no Capítulo 14, veremos como a mobilidade celular é crítica para que células cancerígenas invadam e sofram metástase.

Tabela 5.4 Exemplos de integrinas e seus ligantes na matriz extracelular

Integrina	Ligante da ECM
$\alpha 1\beta 1$	Colágeno, laminina
$\alpha 1\beta 1$	Vitronectina, fibronectina
$\alpha v\beta 3$	Vitronectina, fibrinogênio, trombospodina
$\alpha 5\beta 1$	Fibronectina
$\alpha 6\beta 1$	Laminina
$\alpha 7\beta 1$	Laminina
$\alpha 2\beta 3$	Fibrinogênio
$\alpha 6\beta 4$	Laminina epitelial de hemidesmosomos

Adaptada, em parte, de B. Alberts et al., Molecular Biology of the Cell, 4th ed. New York: Garland Science, 2002; e de H. Lodish et al., Molecular Cell Biology. New York: W.H. Freeman, 1995*.

* Publicado, em português, pela Artmed Editora, com o título *Biologia Celular e Molecular*, em 2005.

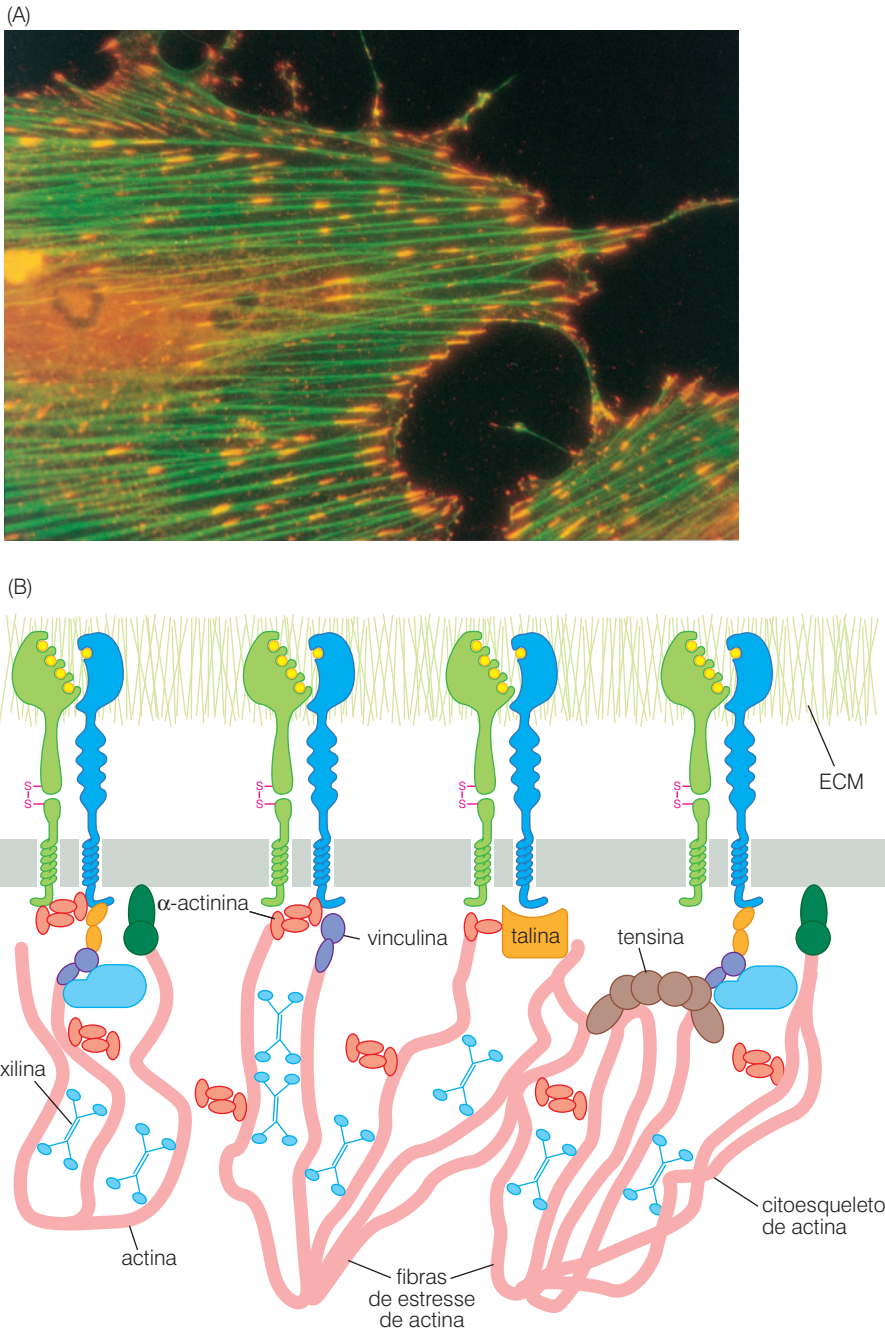


Figura 5.28 Aprisionamento da integrina ao citoesqueleto e à ECM (A) Esta micrografia de fluorescência ilustra discretos focos (amarelo/laranja) na superfície celular, chamados adesões focais, nos quais as células utilizam integrinas para manterem-se restritas à matriz extracelular (ECM). Esse agrupamento também afeta a organização das fibras de actina (verde) que formam o citoesqueleto. (B) Esta figura esquemática da organização das integrinas (verde, azul) indica a associação destas com a ECM (fibras verdes, acima) por meio de seus ectodomínios, bem como sua associação com o citoesqueleto de actina (cadeias rosa) por meio de seus domínios citoplasmáticos via subunidade β de cada heterodímero. Uma série de proteínas intermediárias, como actinina, vinculina e talina, permite que essas ligações sejam formadas. (A, cortesia de Keith Burridge; B, adaptada de C. Miranti e J. Brugge, *Nat. Cell. Biol.* 4:E83-E90, 2002.)

Essas descrições de receptores de tirosina cinase e integrinas revelam que células de mamíferos utilizam receptores especializados de superfície celular para sentir dois tipos distintos de moléculas extracelulares. Alguns receptores, como EGF e PDGF, sentem fatores de crescimento solúveis (ou solubilizados), enquanto outros, notavelmente as integrinas, sentem a fixação ao arcabouço essencialmente insolúvel da ECM. Juntos, esses receptores permitem que células normais determinem se duas condições preexistentes foram satisfeitas antes que esta célula cresça ou prolifere: a célula deve sentir a presença de níveis adequados de fatores de crescimento mitogênicos em suas redondezas e a existência de um ancoramento adequado à ECM.

Ambos os requerimentos para a proliferação celular podem ser abolidos se a célula carrega um oncogene *ras* ativado. Então, células transformadas por *ras* podem crescer na presença de concentrações relativamente baixas de fatores de crescimento mitogênicos associados, ou não, ao soro; além disso, diversos tipos de células transformadas por *ras* podem proliferar de forma

Barra lateral 5.10 Algumas integrinas são essenciais para a tumorigênese A capacidade de inativar seletivamente (“nocaute”) genes de tecidos-alvo tornou possível avaliar a contribuição de diversas proteínas sinalizadoras para a tumorigênese. Por exemplo, a inativação de um gene codificando a integrina $\beta 1$ da linhagem germinativa de camundongo leva à letalidade embrionária; no entanto, a introdução de um alelo “condicional” na linhagem germinativa de camundongo permitiu a inativa-

ção desse gene especificamente nas células epiteliais da glândula mamária de camundongo (Figura 5.29A, B). Tal inativação de ambas as cópias do gene da integrina $\beta 1$ possui um efeito mínimo no desenvolvimento da glândula mamária. Porém, se um transgene especificando o oncogene “middle T” do poliomavírus é expresso em tecido de mama desses camundongos, os nódulos pré-malignos hiperplásicos normalmente observados são reduzidos em mais de 75%, e as células negativas para integrina $\beta 1$ são total-

mente incapazes de desenvolver-se para formar carcinomas mamários (Figura 5.29C). Análises detalhadas indicaram que essa perda da expressão da integrina $\beta 1$ permite que as células epiteliais que expressam o oncogene sobrevivam, bloqueando, porém, a sua proliferação ativa. Isso sugere, de forma bastante especulativa, que interferir na expressão ou função da integrina $\beta 1$ pode ser útil no bloqueio do desenvolvimento de alguns tipos de tumores humanos.

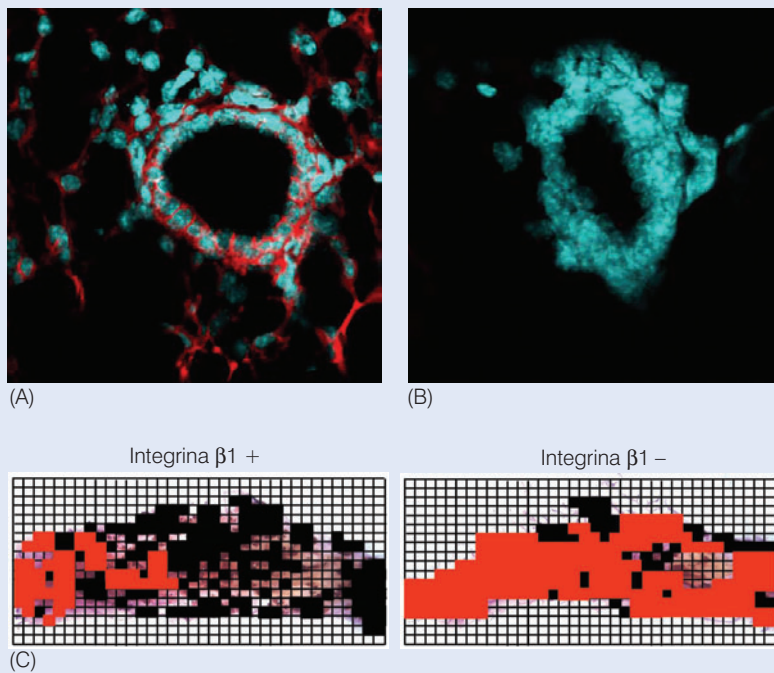


Figura 5.29 Integrina $\beta 1$ e tumorigênese mamária A inativação seletiva do gene que codifica a integrina $\beta 1$ da glândula mamária permite um teste da sua importância na tumorigênese. (A) A imunocoloração da integrina $\beta 1$ (vermelho) por entre as células que formam o ducto mamário de camundongo (azul). (B) Na ausência de integrina $\beta 1$, a morfogênese dos ductos ainda prossegue normalmente. Além disso, o desenvolvimento geral da glândula mamária é normal (não-mostrado). (C) Em um camundongo transgênico suscetível à tumorigênese mamária (esquerda), nódulos pré-malignos hiperplásicos, mostrados mediante um exame por microscopia de toda a glândula mamária, estão presentes em abundância (quadrados pretos). No entanto, a grande maioria desses nódulos falha ao formar glândulas mamárias nas quais as células epiteliais foram privadas da expressão de integrina $\beta 1$ (direita). (De D.E. White et al., *Cancer Cell* 6:159-170, 2004.)

independente de adesão. Esses comportamentos sugerem que, de alguma forma, a oncoproteína Ras é capaz de mimetizar os sinais introduzidos em uma célula por receptores de fatores de crescimento ativados por ligante e por integrinas que possuem componentes da ECM. O entendimento das bases bioquímicas desses vários sinais necessita de algum conhecimento da estrutura e da função da proteína Ras, tanto a normal quanto a oncogênica. Assim, retornaremos à história de meados dos anos 1980 para ver como o enigma da função da Ras foi solucionado.

5.9 A proteína Ras, um componente aparente da cascata de sinalização *downstream*, atua como proteína G

A descoberta de que dois oncogenes – *erbB* e *sis* – codificam componentes da maquinaria de sinalização de fatores de crescimento mitogênicos (Seções 5.4 e 5.5) iniciou um esforço intenso para relatar outras oncoproteínas relacionadas, notavelmente a oncoproteína Ras, a essa maquinaria de sinalização. O oncogene *ras* claramente desencadeia muitas das mesmas mudanças nas células que haviam sido verificadas quando as células eram transformadas tanto com *src* quanto com *erbB* ou *sis*. Havia algum tipo de cascata de sinalização – uma brigada molecular – operando na célula, na qual a proteína A transferiria um sinal para a proteína B, que, por sua vez, sinalizaria para uma proteína C? E se tal cascata existisse, a oncoproteína Ras poderia ser encontrada em algum lugar *downstream* de *erbB* e *sis*? Os sinais emitidos por essas diversas proteínas convergiam, todos, para algum alvo em comum ao final dessa cascata de sinalização hipotética?

Em nível bioquímico, estava claro que ligantes de fatores de crescimento ativavam receptores de tirosina cinase, e que esses receptores respondiam ativando seus domínios de tirosina cinase citoplasmáticos. Porém, quais proteínas eram afetadas a partir de então pelos eventos de fosforilação do receptor resultantes? E como essa fosforilação levaria a uma resposta mitogênica da célula – a entrada desta em uma fase ativa de crescimento e divisão? Em meados dos anos 1980, o progresso nessas questões-chave permaneceu praticamente estagnado, já que os experimentos bioquímicos não ofereciam nenhuma forma óbvia de se mover dos receptores de tirosina cinase para as cascatas de sinalização *downstream*.

Enquanto isso, progresso substancial estava sendo feito no entendimento da bioquímica da proteína Ras. De fato, os três genes distintos de *ras* em células de mamíferos (Tabela 4.2) codificam quatro proteínas Ras distintas (já que *K-ras* especifica uma segunda proteína por meio de *splicing* alternativo de um precursor de mRNA). Já que praticamente todas as proteínas Ras possuem estruturas praticamente idênticas e funcionam de maneira similar, nos referiremos a elas simplesmente como “Ras” na discussão que se segue. Em sua porção C-terminal, todas elas carregam caudas lipídicas covalentemente ligadas, compostas de grupos farnesil, palmitoil ou geranilgeranil (ou combinações de diversos desses grupos). Essas porções lipídicas permitem que as proteínas Ras, todas com cerca de 21 kDa de massa, tornem-se ancoradas a membranas citoplasmáticas, em grande parte à face citoplasmática da membrana plasmática.

(Durante muitos anos, pareceu que esse ancoramento na membrana era atingido por meio da inserção de várias caudas lipídicas diretamente ao ambiente hidrofóbico de diversas bicamadas lipídicas. No entanto, estudos mais recentes indicaram uma complexidade muito maior. No caso de H-Ras, por exemplo, a porção palmitato está de fato inserida diretamente na membrana citoplasmática, ao passo que seu grupo farnesil está inserido em um bolso hidrofóbico de uma proteína especializada de ligação a farnesil; este último, por sua vez, facilita as interações de H-Ras com outras proteínas e fortalece a ligação de H-Ras a diversas membranas.)

Como as proteínas G heterotrimericas (Seção 5.7), Ras era conhecida por se ligar e hidrolisar (i.e., clivar) nucleotídeos de guanosina. Essa ação como GTPase indicava um modelo de ação um tanto quanto diferente do das tirosina cinases Src e erbB, e, de forma intrigante, todas essas três oncoproteínas possuíam efeitos similares no comportamento celular.

Em outra analogia às proteínas G, descobriu-se que Ras é capaz de (1) ligar-se à molécula de GDP em seu estado quiescente, inativo; (2) descartar seu GDP ligado após receber algum sinal estimulatório *upstream* na cascata sinalizadora; (3) adquirir uma molécula de GTP no lugar da molécula de GDP recentemente adquirida; (4) modificar-se para uma configuração ativa, emissora de sinal, enquanto ligada a seu GTP; e (5) clivar este GTP após um curto período utilizando sua própria função intrínseca de GTPase, colocando-se, assim, novamente em sua configuração que não emite sinal (Figura 5.30). De fato, a molécula de Ras parece

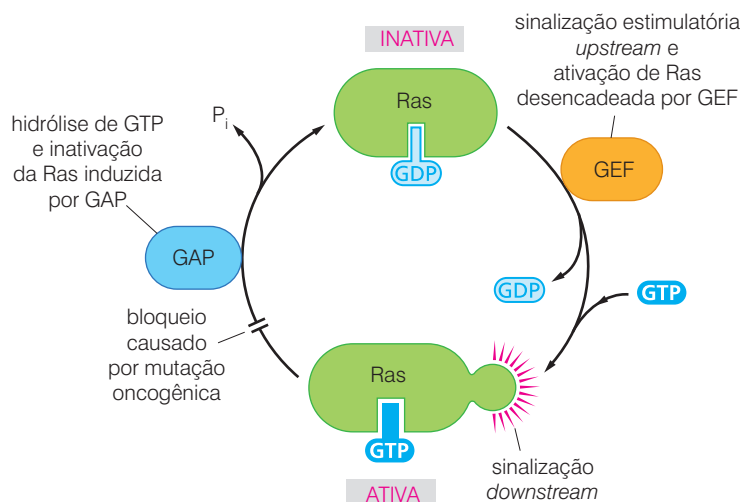


Figura 5.30 O ciclo de sinalização de Ras. Estudos detalhados da bioquímica das proteínas Ras revelaram que elas, como as proteínas G heterotrimericas (veja a Figura 5.25), operam como tomadas binárias, ligando GDP em seu estado inativo (*acima*) e GTP em seu estado ativo, capaz de emitir sinal (*abaixo*). Assim, uma proteína Ras inativa, ligada a GDP, é estimulada por um GEF (fator trocador de nucleotídeos de guanina, *laranja*) a liberar seu GDP e adquirir um GTP em seu lugar, colocando a Ras em seu estado ativo, em uma configuração sinalizadora. Este momento da sinalização é interrompido após um curto período pela ação de GTPase intrínseca da Ras, que hidrolisa GTP a GDP (*esquerda*). Esta atividade de GTPase é fortemente estimulada pelas GAPs (proteínas ativadoras de GTPase) que a Ras pode encontrar enquanto está em seu estado ativado. Substituições de aminoácidos causadas por mutações pontuais em proteínas oncogênicas bloqueiam esse ciclo, inativando a atividade de GTPase intrínseca de Ras; assim, Ras fica aprisionada em sua forma ativada, emissora de sinal.

se comportar como um interruptor de luz que foi desligado automaticamente após um certo tempo pré-determinado.

Em maior detalhe, a cadeia de eventos hipotética ocorreu dessa forma. Sinais mitogênicos, talvez transduzidos de alguma forma pelos receptores de tirosina cinase, ativaram o fator trocador de nucleotídeos de guanina (GEF) para a Ras. Esta proteína Ras inativa induzida por GEF pode trocar seu GDP por um GTP. A proteína Ras ativada resultante emitiria sinais para um (ainda desconhecido) alvo ou grupo de alvos *downstream*. Este momento da sinalização teria fim, cedo ou tarde, quando a Ras decidisse hidrolisar seu GTP ligado. Fazendo isso, a Ras retornaria ao seu estado não-sinalizador. Conforme descoberto depois, um grupo de outras proteínas chamadas GAPs poderia intervir ativamente e encorajar Ras a realizar a hidrólise (Barra lateral 5.11). Está implicada nesse modelo (veja a Figura 5.30) a noção de que Ras atua como uma proteína transdutora de sinal, recebendo sinais *upstream* na cascata de sinalização e passando-os, subsequentemente, para um alvo *downstream*.

Uma descoberta surpreendente foi feita durante a análise bioquímica detalhada da oncoproteína Ras realizada com um oncogene de *ras* mutado de forma pontual, mais especificamente, a oncoproteína Ras codificada pelo vírus de sarcoma de Harvey. Conforme a proteína Ras normal, a oncoproteína Ras poderia ligar GTP. No entanto, a oncoproteína havia perdido praticamente toda sua atividade de GTPase (veja a Figura 5.30). Em tal condição, ela seria mantida em seu estado ativado, na conformação emissora de sinal para algum sinal estimulatório anterior e para o GEF. Porém, uma vez nesse estado ativado, a oncoproteína Ras não seria capaz de se desligar! O ciclo de retroalimentação negativa, que é tão essencial para a operação normal da proteína Ras, foi sabotado por essa mutação pontual e pela resultante substituição de aminoácido (Figura 5.31).

Esses fatos forneceram uma explicação clara de como Ras pode operar como uma oncoproteína: em vez de enviar sinais curtos, pulsos cuidadosamente racionados de sinais estimuladores de crescimento, a oncoproteína emitiria sinais por um longo tempo, possivelmente por um período indefinido, inundando a célula com eles, seja qual for a natureza destes. A análise subsequente da bioquímica da proteína Ras revelou níveis adicionais de controle que poderiam estar corrompidos em células cancerígenas (Barra lateral 5.11).

Tais descobertas forneceram uma solução para um “quebra-cabeça” criado pelo seqüenciamento do oncogene *ras* mutante em muitos tumores humanos. Conforme aprendemos (Seção 4.4), as mutações pontuais que originaram essas oncoproteínas são invariavelmente mutações de **sentido trocado** (que causam uma substituição de aminoácidos) em vez das mutações **sem sentido** (que fazem com que ocorra uma terminação prematura da cadeia protéica nascente). E, invariavelmente, elas atacam tanto os códons número 12 e 61 da fase de leitura dos oncogenes *ras* (ou, em alguns casos raros, o 13º códon).

Podemos imaginar que esses nucleotídeos em particular representam sítios no DNA genômico que são particularmente suscetíveis ao ataque e alteração por carcinógenos mutagênicos. No entanto, o estudo detalhado da estrutura das proteínas Ras, como dados gerados por cristalografia de raios X (veja a Figura 5.31), tem levado a um modelo bastante convincente. O exame dos resíduos números 12, 13 e 61 dessas proteínas revelou que eles estão localizados ao redor da cavidade na proteína Ras na qual a atividade catalítica de GTPase ocorre. Por consequência, praticamente todas as substituições desses três aminoácidos, como a substituição de uma glicina por uma valina encontrada anteriormente, são capazes de comprometer a função de GTPase. (Mais precisamente, elas comprometem a atividade de proteínas ativadoras de GTPase [GAPs, veja a Figura 5.30] para desencadear a hidrólise do GTP ligado por Ras.)

Sabendo disso, podemos imediatamente entender por que mutações pontuais afetando apenas um número limitado de resíduos de aminoácidos são encontradas nos oncogenes de *ras* carregados nos genomas de células de tumor humanas. Alterações em grande escala nos proto-oncogenes de *ras*, como deleções, são claramente improdutivas para o câncer, já que elas resultariam na eliminação da função de Ras, em vez de em um aumento desta. De forma similar, a grande maioria das mutações pontuais atingindo proto-oncogenes de *ras* originarão

Barra lateral 5.11 Proteínas ativadoras de GTPase e câncer Quando proteínas Ras purificadas são examinadas de forma isolada, elas demonstram uma atividade de GTPase bastante baixa. No entanto, em células vivas, está claro que a forma que liga GTP de Ras pode interagir com uma segunda classe de proteínas, chamadas GAPs (proteínas ativadoras de GTPase). Essa interação causa um aumento de até mil vezes na atividade de GTPase da proteína Ras, resultando em uma conversão rápida da forma ativa, ligada a GTP, de Ras em sua forma inativa, ligada a GDP. (A proteína Ras-GAP, uma das duas GAPs conhecidas que são capazes de atuar na Ras, foi identificada como capaz de inserir um “dedo” de arginina na fenda de GTPase de Ras; fazendo isso, ela participa ativamente da catálise que converte GTP em GDP.)

O tempo de vida da forma ativada, ligada a GTP, de Ras pode, dessa forma, ser governado pelo tempo necessário para que ela se encontre com uma molécula de GAP. Já que as GAPs também podem ser controladas por outros sinais, isso significa que a atividade de GTPase das proteínas Ras é modulada indiretamente por outras vias de sinalização. Além disso, conforme será descrito posteriormente (Seção 7.10), a perda pela célula de uma outra forma de Ras GAP, chamada NF1, provoca uma diminuição anormal na atividade GTPase de Ras nessa célula, resultando no acúmulo de Ras carregada com GTP – causando hiperatividade da sinalização de Ras – e, finalmente, na formação de um tumor neuroectodermal.

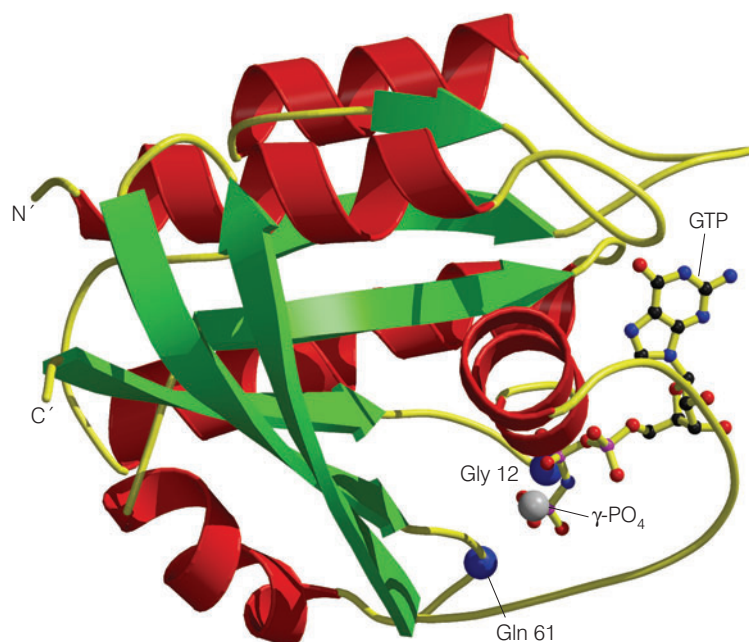


Figura 5.31 A estrutura da proteína Ras. Este diagrama da estrutura da proteína Ras, conforme determinada por cristalografia de raios X, demonstra o arranjo da cadeia polipeptídica de Ras em seus domínios α -hélice (vermelho) e fitas β -dobradas (verde). O GTP está indicado como uma figura em bastão, e os dois resíduos de aminoácidos mais frequentemente encontrados como mutados em oncoproteínas tumorais humanas – glicina 12 e glutamina 61 – estão mostrados como bolas azuis. É possível verificar que ambos os resíduos estão fortemente relacionados com a porção γ -fosfato do GTP (bola cinza), o que pode fornecer uma explicação de por que as substituições nesses resíduos afetam a atividade de GTPase, e, portanto, por que códonos que especificam esses resíduos são preferencialmente mutados no genoma de células tumorais humanas. (Cortesia de A. Wittinghofer.)

proteínas Ras mutantes que perderam, em vez de ganharem, a capacidade de emitir sinais estimulatórios de crescimento. Apenas quando a habilidade de emitir sinais de Ras permanece intacta e seu mecanismo de retroalimentação negativa de GTPase é inativado seletivamente (por substituições de aminoácidos em um de seus três sítios) a proteína Ras adquire um poder *aumentado* de promover a proliferação celular, transformando a célula.

Apenas as células que, de forma pouco comum, adquirem mutações afetando um dos três resíduos de aminoácidos de Ras (resíduos 12, 61 ou, raramente, 13) possuem vantagem proliferativa em relação a suas semelhantes do tipo selvagem, possuindo a chance de se tornarem as ancestrais das células de uma massa tumoral. Assim, ainda que mutações pontuais que afetem todos os resíduos de aminoácidos da proteína Ras possam ocorrer em frequências comparáveis, apenas aquelas poucas capazes de conferir vantagem proliferativa substancial irão realmente ser encontradas em células de tumor. Outras células que adquirem mutações pontuais afetando outros resíduos da proteína Ras irão reter o fenótipo normal ou mesmo perder sua capacidade proliferativa.

5.10 Sinopse e perspectivas

Em meados dos anos 1980, a descoberta de oncogenes como *erbB* e *sis* revelou as conexões íntimas existentes entre a sinalização de fatores de crescimento e os mecanismos de transformação celular. Mais especificamente, essas conexões sugeriram que a transformação celular resulta da hiperativação de vias de sinalização mitogênicas. Tal noção concentrou o interesse dos pesquisadores nos mecanismos bioquímicos da carcinogênese. Muitos deles começaram a estudar os receptores de fatores de crescimento e seus mecanismos bioquímicos de ação.

Um grande problema acerca dos receptores de fatores de crescimento é o mecanismo utilizado por eles para transferir sinais de fora da célula para o seu interior. Um modelo simples foi logo desenvolvido para explicar como isso ocorre: os ligantes de receptores de fatores de crescimento ligam-se aos ectodomínios dos primeiros. Fazendo isso, eles encorajam moléculas de receptor a se aproximar e formar dímeros. A dimerização dos ectodomínios de receptor, inicialmente alcançada pelos fatores de crescimento, por sua vez, estimula a dimerização dos domínios citoplasmáticos dos receptores. De alguma forma, isso faz com que os domínios citoplasmáticos possam emitir sinais.

No entanto, esse modelo não foi capaz de explicar, em nível bioquímico, como os receptores emitem sinais. Para isso, pesquisas na bioquímica da proteína Src foram de grande valia. Foi descoberto que uma tirosina cinase (TK), uma enzima que transfere grupos fosfato para as cadeias laterais de resíduos de tirosina de diversas proteínas-substrato, desempenhava este papel. Uma vez que as seqüências de aminoácidos de diversos receptores de fatores de crescimento foram analisadas, os domínios citoplasmáticos desses receptores foram descobertos como estruturalmente (e também funcionalmente) relacionados à Src. Assim, as tirosina cinases são a forma pela qual os receptores de fatores de crescimento emitem sinais bioquímicos.

Essa informação foi então integrada no modelo de dimerização do receptor: quando os receptores de fatores de crescimento são induzidos pela ligação do ligante a dimerizar, a tirosina cinase de cada monômero de receptor transfosforila o domínio citoplasmático do outro monômero. Isso resulta em caudas citoplasmáticas fosforiladas de moléculas de receptor que, de alguma forma desconhecida, permitem que a sinalização prossiga. Grande parte do próximo capítulo está focada nesses mecanismos de sinalização *downstream*.

A sinalização hiperativa por esses receptores está presente em muitos tipos de células cancerígenas humanas. Frequentemente, os receptores são superexpressos, resultando em ativação independente de ligante. Uma ativação independente de ligante ainda mais potente é alcançada por muitos tipos de alterações no receptor. Muitas dessas ocorrem como conseqüências de mutações somáticas, mas um número de alelos mutantes dos genes do receptor foi encontrado no *pool* genético humano; eles estão associados a uma variedade de síndromes inatas de suscetibilidade a câncer.

Os receptores de fatores de crescimento tirosina cinase (RTKs) são apenas uma dentre muitas outras formas pelas quais as células sentem seus arredores. Os receptores TGF- β , por exemplo, são superficialmente similares aos RTKs, já que ambos possuem um ectodomínio ao qual o ligante se liga e um domínio cinase emissor de sinal na sua porção citoplasmática. No entanto, as cinases dos receptores TGF- β são serina/treonina cinases e, conforme aprenderemos depois, sinalizam por meio de mecanismos muito diferentes.

Uma vasta gama de outros receptores transdutores de sinal foi descoberta, incluindo os das classes Notch, Patch-Smoothed e Frizzled. Esses receptores utilizam mecanismos de transdução de sinal diversos para liberar sinais para o citoplasma. Conforme veremos ao longo deste livro, a sinalização aberrante por esses receptores possui um papel importante na patogênese de muitos cânceres humanos.

As células também devem sentir seu contato com a matriz extracelular (ECM) – a gaiola de glicoproteínas e proteoglicanas secretadas que circunda cada célula de um tecido. Aqui, uma outra classe de receptores, as integrinas, possui um papel central. Tendo ligado componentes da matriz extracelular, os receptores heterotriméricos de integrina transduzem sinais para dentro da célula que estimulam a proliferação e suprimem o programa apoptótico de suicídio celular.

Uma linha distinta de pesquisa, realizada em paralelo, elucidou a bioquímica da proteína Ras, outro componente-chave na patogênese do câncer. Ras opera como um interruptor binário, continuamente passando de um estado ativo, emissor de sinal, para um estado quiescente. Os alelos mutados encontrados em células de câncer provocam substituições de aminoácidos nas porções GTPase da proteína Ras, desarmando, dessa forma, o mecanismo que estas proteínas utilizam para se desligarem. Isso aprisiona a proteína Ras em sua configuração ativa, emissora de sinal, por longos períodos, fazendo com que as células sejam inundadas por sinais mitogênicos de forma contínua.

Porém, essas investigações revelaram como componentes isolados da maquinaria de sinalização celular (como RTKs, Ras) funcionam, sem providenciar um esclarecimento da forma como elas se comunicam umas com as outras. Isto é, a *organização* do circuito de sinalização permaneceu um mistério. A fisiologia celular apontava fortemente para que ErbB (o receptor de EGF) e outros receptores de tirosina cinase operassem em uma via comum de sinalização

com a oncoproteína Ras. Src também se encaixaria nesse contexto. Essas várias oncoproteínas, possuidoras de funções bioquímicas diversas, foram identificadas como exercendo efeitos bastante similares nas células. Todas elas causaram o agrupamento de células em uma cultura em monocamada, a perda de inibição pelo contato, a aquisição de independência de ancoragem e a redução do requerimento celular de fatores de crescimento mitogênicos em seu meio de cultura. Essa função em comum sugeriu a participação em uma cascata comum de sinalização.

Uma conexão possível entre Ras e os receptores de tirosina cinase veio da descoberta de que um oncogene *ras* ativado fazia com que muitos tipos celulares produzissem e liberassem fatores de crescimento. Mais proeminente entre estes estava o fator de crescimento transformante α (TGF- α), um fator de crescimento similar a EGF que foi identificado como sendo liberado por várias células transformadas por oncogenes. Como EGF, TGF- α se liga e ativa o receptor EGF (veja a Figura 5.16C). Isso sugeriu o seguinte cenário: uma vez liberado por uma célula transformada por *ras*, TGF- α poderia atuar de maneira autócrina (veja a Figura 5.12B) para ativar receptores EGF presentes na superfície da célula. Isso, por sua vez, desencadearia uma série de respostas bastante similares às criadas por um mutante, constitutivamente ativado, receptor de EGF. Quando vista por essa perspectiva, Ras parece operar *upstream* de um receptor de fator de crescimento em vez de ser um componente importante da cascata celular *downstream* do receptor (Figura 5.32A).

No final, esse esquema autócrino foi capaz de explicar apenas uma pequena parte da função de *ras*, já que *ras* também foi descoberta como capaz de transformar células que não possuem receptores para os fatores de crescimento que ela induziria. Além disso, muitas evidências

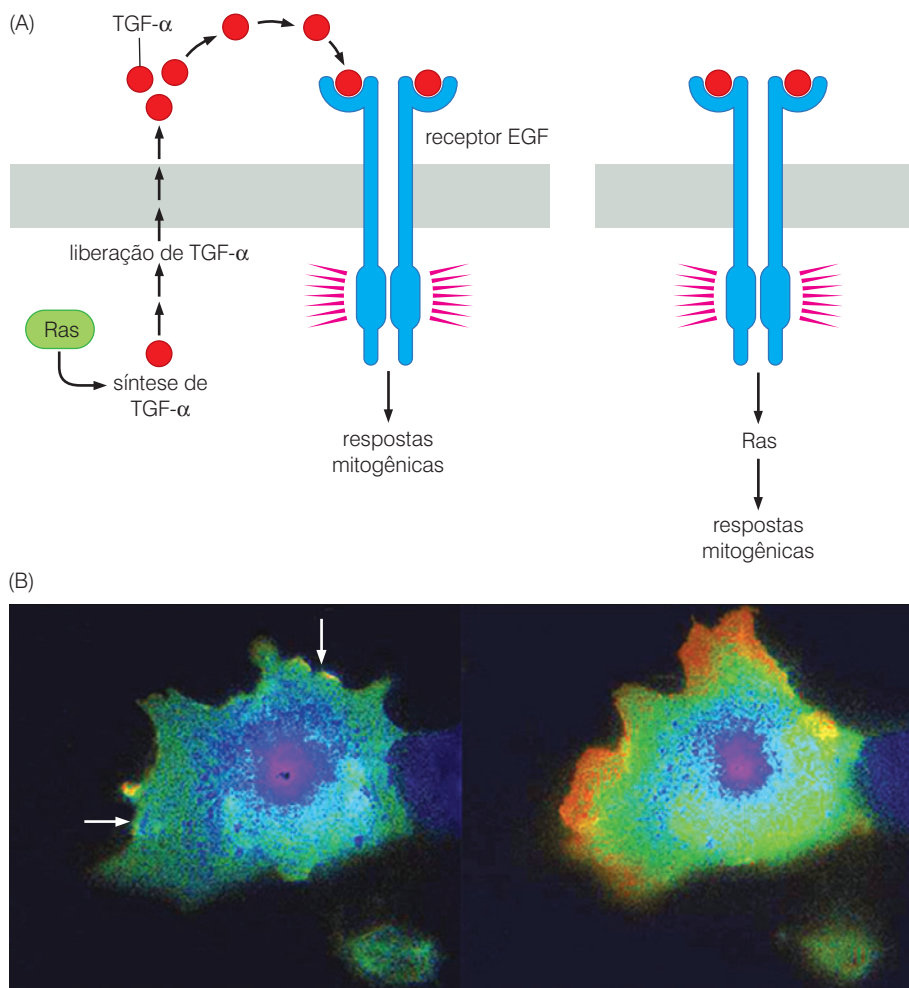


Figura 5.32 Mecanismos alternativos de transformação por Ras (A) Uma ilustração (esquerda) de como Ras (verde) normalmente opera para promover a proliferação celular foi inspirada pela observação de que células transformadas por *ras* liberam um grande número de fatores de crescimento para seus arredores, como o TGF- α , mostrado aqui (círculos vermelhos). Uma vez secretados, fatores de crescimento como TGF- α podem atuar de forma autócrina para ativar um receptor, como o receptor EGF mostrado aqui, promovendo a proliferação celular. Nesta ilustração, Ras opera *upstream* ao receptor EGF. Um esquema alternativo (direita) coloca Ras no meio da cascata de sinalização que opera *downstream* aos receptores de fatores de transcrição como o receptor EGF. (B) Diversas evidências favorecendo o segundo esquema foram acumuladas. Este exemplo gráfico, por exemplo, produzido anos depois, mostra que, cinco minutos após a adição de EGF às células, a proteína Ras previamente inativa (sombra azul) torna-se ativada próxima à superfície celular (sombra vermelha). (Essa resposta é tão rápida que indica uma comunicação próxima entre o receptor EGF e Ras.) Interessantemente, essa ativação ocorreu apenas nos dois lados da célula (setas brancas) que não estavam em contato com células vizinhas. (B, de N. Mochizuki et al., *Nature* 411:1065-1068, 2001.)

bioquímicas sugeriram que a ligação do ligante de receptores de fatores de crescimento leva rapidamente à ativação de Ras (Figura 5.32B). Isso deixa disponível apenas uma alternativa: a sinalização intracelular direta entre receptores de fatores de crescimento ativados por ligante e a proteína Ras. Assim, a busca estava em encontrar as conexões bioquímicas entre os receptores de tirosina cinase e as proteínas como Ras, que parecem formar componentes hipotéticos *downstream* na cascata de sinalização.

A utilização da bioquímica para descobrir essas conexões teve limitações sérias. Como este capítulo deixou claro, a bioquímica fornece poderosas ferramentas aos pesquisadores para que sejam elucidados os funcionamentos de proteínas celulares individuais, isoladas. No entanto, ela possui utilidade limitada para revelar como proteínas diferentes podem conversar umas com as outras. Se realmente existem cascatas de sinalização na célula na forma de $A \rightarrow B \rightarrow C$, a bioquímica pode muito bem revelar como A ou C atuam de forma isolada (i. e., como uma cinase ou GTPase), sem esclarecer a organização da via de sinalização que existe entre elas.

A caracterização detalhada de células de tumores humanos que superexpressam certos receptores de fatores de crescimento também sugeriu outra dimensão de complexidade. No caso de cânceres de mama humanos, a superexpressão dos receptores HER2/Neu (veja a Seção 4.3) foi descoberta como correlacionada com um complexo arranjo de fenótipos apresentados pelas células cancerígenas associadas. As células expressando níveis elevados dessa proteína mostraram aumento nas taxas de síntese de DNA, crescimento independente de ancoragem melhorado, maior eficiência na formação de tumores quando implantadas em camundongos hospedeiros (i. e., tumorigenicidade), maior tendência a entrar em metástase e menos dependência de estrogênio para o crescimento. Assim, essas proteínas receptoras estavam agindo pleiotropicamente para conferir um grande número de mudanças distintas nas células cancerosas. Tal ação pareceu incompatível com uma cascata de sinalização linear simples operando *downstream* de receptores ativados. Pelo contrário, parecia mais provável que um número distinto de vias de sinalização *downstream* era irradiado desses receptores, cada uma delas em provocar um fenótipo celular distinto de câncer. Porém, mais uma vez, parecia haver poucas perspectivas para o mapeamento dessas vias e de seus componentes sinalizadores.

Esse impasse poderia ser resolvido apenas pela exploração de novas ferramentas experimentais e de uma nova forma de pensar sobre a organização de circuitos complexos de sinalização. A ciência da genética providenciou o novo conjunto de ferramentas e as novas idéias. No entanto, a genética poderia ser praticada com facilidade apenas em organismos experimentalmente simples para os quais poderosas técnicas de genética haviam sido desenvolvidas, especificamente, aquelas associadas ao estudo de moscas, vermes e leveduras.

Como foi descoberto, o sucesso na elucidação dessas cascatas de sinalização também dependia de mais um fator. Muito já havia sido aprendido a partir do estudo detalhado de metazoários simples e outros eucariotos unicelulares. As lições aprendidas sobre os sistemas de sinalização desses organismos poderiam ser transferidas para as cascatas de sinalização operando nas células de mamíferos? Aqui, a sorte favoreceu os biólogos do câncer. Já que as cascatas de sinalização intracelulares pertenciam a uma linhagem antiga e haviam se modificado muito pouco ao longo de várias centenas de milhares de anos, as descobertas sobre a organização e planejamento no verme, mosca e levedura provaram ser diretamente aplicadas às células de mamíferos. A consequência foi um enriquecimento da biologia celular do câncer por áreas de pesquisa que pareciam, ao menos superficialmente, distantes e irrelevantes para o entendimento do câncer humano. Como freqüentemente ocorre na pesquisa do câncer, os avanços importantes vieram de fontes inesperadas, das bancadas de cientistas que nunca haviam se imaginado como soldados na batalha contra o câncer.

Conceitos-chave

- Já que um organismo multicelular pode existir apenas se suas células individuais trabalhem de forma coordenada, o problema da comunicação célula-célula deve ter sido resolvido quando os metazoários surgiram. A desregulação de tal sinalização celular é central para a formação do câncer.

- Src constituiu a primeira descoberta de como as oncoproteínas atuam quando foi identificada como uma proteína cinase – uma enzima que transfere grupamentos fosfato do ATP para outras proteínas da célula. Já que múltiplos substratos protéicos poderiam ser fosforilados, e já que cada uma dessas proteínas poderia afetar seu próprio grupo de alvos *downstream*, isso explicaria como Src poderia agir pleiotropicamente para ocasionar numerosas alterações fenotípicas observadas em células transformadas por RSV.
- Src liga grupamentos fosfato em resíduos de tirosina de proteínas, em vez de resíduos de serina e treonina, tipicamente fosforilados pela maioria das proteínas cinases. Pesquisas subsequentes mostraram que a fosforilação da tirosina é utilizada principalmente por vias de sinalização mitogênicas.
- O fator de crescimento epidermal (EGF) foi descoberto como desencadeador de efeitos mitogênicos em diversos tipos celulares epiteliais, mas apenas se fosse capaz de se ligar às superfícies. Isso sugeriu o envolvimento de um receptor de superfície celular, posteriormente isolado de uma linhagem celular tumoral humana.
- Uma vez que o ectodomínio N-terminal do receptor EGF liga-se a EGF, um sinal é transmitido através da membrana plasmática que ativa a cinase semelhante à Src presente no domínio citoplasmático C-terminal. A cinase, então, fosforila resíduos de tirosina no próprio receptor de EGF, o que emite sinais que induzem a proliferação celular.
- O receptor EGF e a oncoproteína ErbB são proximamente relacionados. A oncoproteína ErbB estimula muito a proliferação celular emitindo sinais estimulatórios de crescimento de forma constitutiva. A sinalização hiperativa dos receptores de fatores de crescimento (normalmente devido à superexpressão ou a alterações estruturais) pode ser encontrada em muitas células de cânceres humanos.
- A relação próxima entre a cadeia B de PDGF e a oncoproteína Sis do vírus de sarcoma de símios sugeriu um mecanismo adicional para a transformação celular. O oncogene *sís* do vírus faz com que uma célula infectada pelo vírus libere diversas cópias de oncoproteínas similares a PDGF, que se ligam aos receptores de PDGF da mesma célula. Isso cria um círculo de sinalização autócrina, no qual a célula produz seu próprio mitógeno.
- A ligação do ligante a um receptor tirosina cinase induz a sua dimerização. Isso resulta na transfosforilação de resíduos de tirosina localizados no domínio citoplasmático de um receptor fora do domínio cinase imediato. Essa transfosforilação causa a ativação de vias de sinalização *downstream*.
- O modelo da dimerização explica como a superexpressão de receptores de fatores de crescimento favorece a formação de câncer: devido a seu número elevado, as moléculas de receptor colidem freqüentemente quando se movimentam na membrana plasmática, resultando em dimerização, transfosforilação, ativação do receptor e na emissão de sinais mitogênicos.
- Uma variedade de mutações afetando algum dos três domínios de RTK pode desencadear a ativação independente de ligante desses receptores. Eventos de fusão gênica que geram ectodomínios truncados e fusionam as porções restantes desses receptores com proteínas que tendem a se dimerizar ou oligomerizar geram potentes oncoproteínas. Substituições de aminoácidos ou deleções no domínio citoplasmático também podem ser encontradas em alguns cânceres.
- Existem outras classes de receptores que não RTKs que são importantes na patogênese do câncer. Os receptores envolvidos no controle do desenvolvimento de células hematopoiéticas necessitam de tirosina cinases separadas chamadas Jaks, que são associadas não-covalentemente aos seus domínios citoplasmáticos. Receptores de TGF- β são domínios citoplasmáticos de cinase que fosforilam resíduos de serina e treonina, em vez de tirosina. Quando Notch liga um de seus ligantes, esse receptor é clivado duas vezes, liberando um fragmento do domínio citoplasmático que pode então se unir a um complexo nuclear que ativa a expressão gênica. O receptor Patch ligado ao ligante move-se para uma segunda proteína de membrana chamada Smoothened; esta última então induz um complexo citoplasmático a liberar um fator de transcrição que ativa genes-alvo. A ligação de fatores Wnt a um receptor Frizzled desencadeia uma cascata de passos que previne uma cinase citoplasmática de marcar diversas proteínas que promovem o crescimento para a destruição. Receptores acoplados à proteína G (GPCRs) podem ativar proteínas G que se modi-

ficam de um estado ligado a GDP (inativo) para um estado sinalizador ativo ligado a GTP quando ativadas por GCPRs, retornando à forma inativa ao hidrolisar GTP.

- As integrinas são uma grande família de receptores heterotriméricos transmembrana que possuem componentes da ECM como ligantes. As integrinas passam informações para dentro e para fora da célula. Com a ligação do ligante, as integrinas formam adesões focais, que ligam algumas integrinas a componentes do citoesqueleto, por meio de seus domínios citoplasmáticos.
- Como as proteínas G, a Ras liga GDP quando quiescente, trocando GDP por GTP ao receber um sinal para se tornar ativada, emite um sinal e, com a ajuda de proteínas ativadoras de GTPase (GAPs), atua como GTPase para hidrolisar o GTP e se auto-inativar.
- A diferença entre uma proteína Ras normal e sua correspondente oncogênica é, em geral, uma mutação pontual de sentido trocado que oblitera a atividade de GTPase, levando a uma proteína que, uma vez ativada, não é capaz de se desligar.

Questões elaboradas

1. Por que uma via de sinalização autócrina é uma força intrinsecamente desestabilizadora para um tecido normal?
2. Cada fator de crescimento desencadeia seu próprio, bastante característico, grupo de respostas biológicas em uma célula. Como é possível alterar uma célula de modo que suas respostas biológicas a um fator de crescimento (p. ex., EGF) sejam características, em vez das respostas que normalmente ocorrem após ela ser exposta a outro fator de crescimento (p. ex., PDGF)?
3. A responsividade de uma célula à exposição a um fator de crescimento é normalmente atenuada após um certo período (meia hora) e, após, é perdida. De acordo com o que você aprendeu sobre receptores de fatores de crescimento, quais mecanismos podem ser empregados por uma célula para reduzir a sua responsividade a um fator de crescimento?
4. Que evidências você pode citar para embasar a noção de que a ativação dos receptores de fatores de crescimento após a ligação de um ligante com frequência é dependente da dimerização do receptor (em vez de alguma outra mudança molecular no receptor)?
5. De que formas a proteína G heterotrimérica é similar às proteínas G de baixo peso molecular (como a Ras) e de que forma elas diferem fundamentalmente?
6. Por que o estudo de organismos inferiores, notavelmente as leveduras, moscas e vermes, provou ser revelador na caracterização de cascatas de sinalização intracelular e foi menos útil no estudo de receptores de superfície celular?
7. As integrinas exibem um novo tipo de controle, chamado “sinalização de dentro para fora”, no qual sinais intracelulares ditam a afinidade desses receptores a vários ligantes extracelulares (i. e., componentes da matriz extracelular). Por que tal sinalização é requerida pelo fenômeno de mobilidade celular?

Leitura adicional

- Cross M & Dexter TM (1991) Growth factors in development, transformation and tumorigenesis. *Cell* 64, 271–280.
- Giancotti FG & Ruoslahti E (1999) Integrin signaling. *Science* 285, 1028–1032.
- Goldfarb M (1996) Functions of fibroblast growth factors in vertebrate development. *Cytokine Growth Factor Rev.* 7, 311–325.
- Massagué J (2000) How cells read TGF- β signals. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1, 169–178.
- Ostman A & Heldin CH (2001) Involvement of platelet-derived growth factor in disease: development of specific antagonists. *Adv. Cancer Res.* 80, 1–38.
- Schlaepfer DD & Mitra SJ (2004) Multiple contacts link FAK to cell motility and invasion. *Curr Opin. Genet. Dev.* 14, 92–101.
- Schlessinger J (2002) Ligand-induced, receptor-mediated dimerization and activation of EGF receptor. *Cell* 110, 669–672.
- Schwartz MA & Ginsberg MH (2002) Networks and crosstalk: integrin signalling spreads. *Nat. Cell Biol.* 4, E65–E68.
- Ullrich A & Schlessinger J (1990) Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 61, 203–212.
- Yarden Y & Sliwkowski MX (2001) Untangling the signalling network. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 127–137.



CAPÍTULO 6

O Circuito da Sinalização Citoplásmica Programa Muitos dos Traços de Câncer

“Qualquer célula viva carrega consigo as experiências de um bilhão de anos de experimentação por seus ancestrais. Você pode esperar poder explicá-la em poucas e simples palavras.”

Max Delbrück, geneticista, 1966

O câncer é uma doença de proliferação celular descontrolada. Uma vez que o comportamento proliferativo de células cancerígenas é muito aberrante, podemos imaginar que elas criam maneiras totalmente novas de programar seu crescimento e divisão – que o circuito-controle nas células cancerígenas tem uma organização um tanto quanto diferente daquele de células saudáveis normais. Tal fato exacerba consideravelmente as diferenças existentes entre células normais e neoplásicas. Na verdade, os dois tipos de células utilizam circuitos-controle quase idênticos. Células cancerígenas descobrem formas de efetuar modificações relativamente minoritárias na maquinaria de controle que opera dentro das células. Elas “beliscam” os sistemas de controle existentes em vez de demolir toda a maquinaria e constituem uma nova versão a partir dos restos da original.

O presente capítulo trata dessa maquinaria de controle – mais especificamente sobre o circuito de processamento de sinal que opera no citoplasma da célula e governa a proliferação celular. Uma placa de circuito eletrônico é constituída de um complexo espectro de componentes densamente conectados que funcionam como resistores, capacitores, diodos e transistores. A célula também utiliza circuitos constituídos de uma série de componentes intercomunicantes, mas estes são, quase sem exceção, proteínas. Enquanto proteínas individuais e suas funções são relativamente simples, os sistemas operacionais que podem ser constituídos a partir destes componentes em geral são extraordinariamente complexos.

No Capítulo 5, lemos sobre os receptores apresentados na superfície celular que reúnem uma grande variedade de sinais e os canalizam ao citoplasma. Aqui, estudaremos como esses sinais, principalmente aqueles emitidos por receptores de fatores de crescimento, são processados e integrados no citoplasma. Muitas das saídas desse circuito de processamento de sinal são então transmitidas ao núcleo, onde fornecem entradas críticas à maquinaria central que governa a proliferação celular. Nossa discussão sobre esse governador nuclear – o *relógio do ciclo celular* – será feita no Capítulo 8.

Uma única célula pode expressar 20 mil ou mais proteínas distintas, muitas das quais estão ativamente envolvidas nos circuitos regulatórios citoplasmáticos que estão aqui descritos. Essas proteínas regulatórias são encontradas em várias concentrações e em diferentes localizações ao longo do citoplasma. Em vez de estarem fluando em concentrações diluídas na água intracelular, elas formam uma sopa grossa. De fato, até 30% do volume da célula correspondem a proteínas em vez de solvente aquoso.

Essas proteínas devem ser capazes de “conversar” umas com as outras com grande especificidade e precisão. Conseqüentemente, uma proteína sinalizadora operando em uma cascata de sinalização linear deve reconhecer apenas aqueles sinais que vêm de proteína(s) parceira(s) *upstream* e passá-los adiante, ou seja, para sua(s) parceira(s) pretendida(s) *downstream*. Assim, ela vai ignorar as outras milhares de proteínas existentes dentro da célula (Figura 6.1).

Isso significa que cada componente protéico de um circuito de sinalização deve, na verdade, resolver dois problemas. O primeiro refere-se a especificidade: como ele pode trocar sinais apenas com o pequeno subgrupo de proteínas celulares que são seus parceiros de sinalização pretendidos no circuito? Segundo, como essa proteína pode adquirir um acesso rápido, quase instantâneo, às parceiras sinalizadoras, ao mesmo tempo em que operam na sopa viscosa que está presente no citoplasma e núcleo?

Estudamos esse circuito porque seu desenho e operacionalidade fornecem abordagens-chave para explicar como células cancerígenas surgem. Portanto, muitas das oncoproteínas descritas nos capítulos anteriores geram câncer a partir da sua habilidade em causar desequilíbrios na sinalização desse sistema normalmente bem-regulado. Pode-se dizer que câncer é certamente uma doença de proliferação celular inapropriada, mas ao analisarmos as células cancerígenas com maior profundidade, entenderemos o câncer em um nível muito diferente: o câncer é, na verdade, uma doença de processamento de sinalização aberrante.

O presente capítulo irá possivelmente ser o mais desafiador entre todos neste livro. A dificuldade provém da total complexidade bioquímica da transdução de sinal, uma área que é afli-

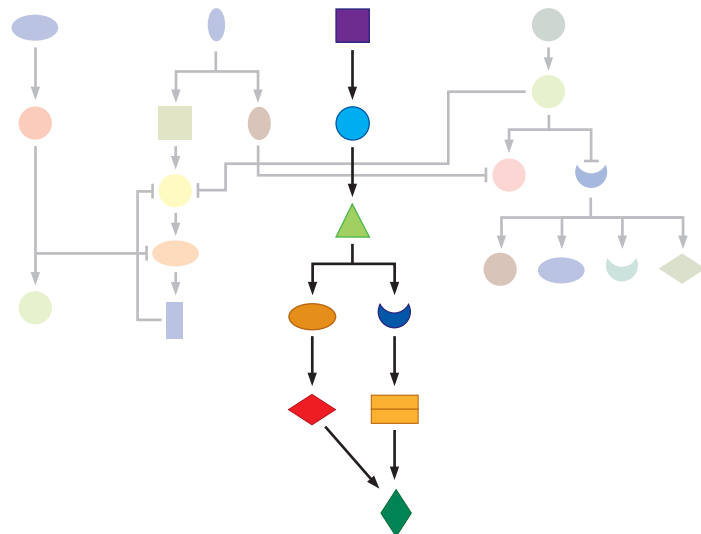


Figura 6.1 Cascatas de sinalização Este diagrama de circuito de sinalização imaginário ilustra como uma cascata de transdução de sinal – uma série de proteínas sinalizadoras que opera de forma extremamente semelhante a uma brigada molecular – passa sinais de uma fonte *upstream* (quadrado roxo) ao seu alvo pretendido *downstream* (diamante verde-escuro) e, ao mesmo tempo, evita a ativação inadvertida de dezenas de outras proteínas sinalizadoras na célula (símbolos de desenho mais fraco).

gida com muitos fatos e abençoada apenas com um pequeno número de princípios unificadores. Assim, absorva este material aos poucos; o todo é demais para apenas uma leitura.

6.1 Uma rota de sinalização vai desde a superfície celular até o núcleo

O crescimento e a divisão que ocorrem nas células após exposição a mitógenos representam claramente programas regulatórios complexos envolvendo as ações coordenadas de centenas, e mesmo milhares, de proteínas celulares distintas. Como podem fatores de crescimento incitar todas essas modificações simplesmente por ligar e ativar seus receptores? E como pode a desregulação destes programas proliferativos induzir a transformação celular? E onde a Ras se ajusta nesse circuito, se de fato isso ocorre?

Uma importante abordagem nessa questão surgiu a partir do exame conduzido em 1981 sobre o comportamento de células normais cultivadas, mais especificamente fibroblastos, que tinham sido privados de fatores de crescimento associados ao soro por alguns dias. Durante esse período de “restrição sorológica”, as células em cultura entrariam, reversamente, em um estado de não-crescimento ou quiescência denominado G_0 (“G zero”). Após permanecerem no estado G_0 por alguns dias, células soro-restritas eram então expostas a soro fresco e, portanto, a quantidades abundantes de fatores de crescimento mitogênicos. O objetivo do experimento era induzir todas as células em tais culturas a entrarem em um estado de crescimento e divisão ativo **sincronicamente** (coordenadamente). De fato, dentro de um período de 9 a 12 horas, a grande maioria dessas células previamente quiescentes começariam a replicar seus DNAs e, muitas horas mais tarde, iniciariam a divisão celular.

Essas modificações observadas no comportamento celular não forneceram nenhuma pista sobre o grande número de modificações moleculares que ocorreram em tais células, em geral decorrentes de alguns minutos de exposição a fatores de crescimento frescos. Por exemplo, dentro de menos de uma hora, a transcrição de um grupo de mais de 100 genes celulares foi induzida (Figura 6.2). A expressão desses genes, que agora chamamos de **genes de início imediato** (IEGs), aumentou rapidamente na primeira meia hora após a estimulação de fatores de crescimento. Como está sugerido nos comentários da Tabela 6.1, os produtos de alguns desses genes auxiliam células de várias formas para emergir do estado G_0 quiescente para seu ciclo ativo de crescimento e divisão. De fato, experimentos envolvendo muitos desses genes demonstrou que o bloqueio da sua expressão previne a emergência das células a partir do estado G_0 .

Uma variação desse experimento (1981) foi realizada, em que soro fresco foi adicionado junto com **cicloeximida**, uma droga que interrompe toda a síntese de proteínas celulares. Apesar da inibição da síntese protéica, a indução dos genes imediatos prosseguiu com certa normalidade. Isso indicou que todas proteínas necessárias para ativar a transcrição desses genes já estavam na posição certa no momento em que o soro foi adicionado à célula. Dito de outra forma, a indução de tais genes não requeria a síntese protéica *de novo* (nova).

Tais resultados também demonstraram que, em adição aos receptores de fator de crescimento na superfície celular, um espectro de outras proteínas estava presente na célula, as quais poderiam conduzir rapidamente sinais mitogênicos dos receptores localizados na superfície celular aos fatores de transcrição (TFs) operando no núcleo. Claramente, a ativação funcional de tais proteínas citoplásmicas transdutoras de sinal não dependia do aumento de suas concentrações (já que cicloeximida não tinha efeito aparente nessa sinalização). Em vez disso, modificações na estrutura, configuração e localização intracelular protéica aparentaram desempenhar um papel dominante na sua ativação funcional logo após a estimulação de receptores de tirosina cinase por seus ligantes de fatores de crescimento.

Os genes de início imediato codificam um número de proteínas interessantes (veja a Tabela 6.1). Algumas destas especificam fatores de transcrição que, uma vez sintetizados, ajudam a induzir uma segunda onda de expressão gênica. Estão incluídos aqui os

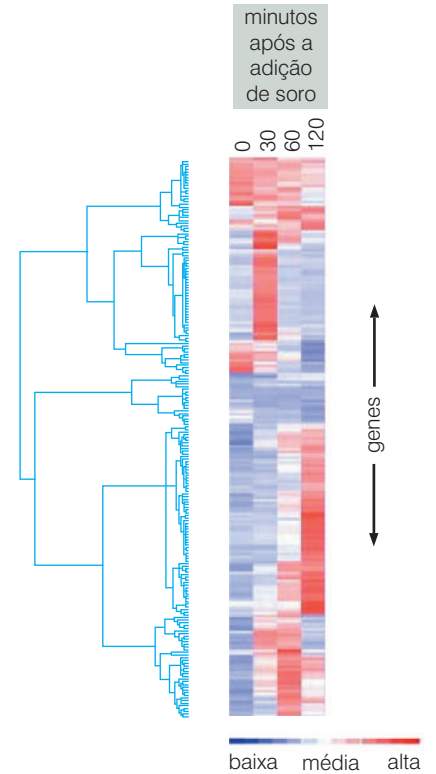


Figura 6.2 Expressão de genes de início imediato A expressão de um amplo espectro de genes de início imediato é induzida dentro das primeiras duas horas após células soro-restritas serem expostas a soro fresco. Essa expressão ocorre mesmo quando a síntese protéica é bloqueada durante esse período, indicando que os fatores de transcrição necessários para tal expressão preexistem nas células soro-restritas. O espectro de expressão gênica aqui utilizado monitorou a expressão de 14.824 genes em 30, 60 e 120 minutos após a adição de soro. As análises dos padrões de expressão resultantes levaram à identificação de 229 genes (*não-etiquetados, arranjados de cima para baixo*) que se comportam como IEGs. Com base nas várias programações de expressão gênica, estes poderiam ser agrupados em 10 subclasses (diagrama de agrupamento hierárquico, esquerda), cada qual apresentando seu próprio programa característico de indução e, em alguns casos, regressão subsequente. *Vermelho* indica alto nível de expressão de RNA, enquanto *azul* indica baixa expressão. Note que alguns IEGs são expressos apenas por um breve período antes de serem reprimidos, ainda que o soro e mitógenos associados continuem a estar presentes no meio de cultura. (De A. Selvaraj and R. Prywes, *BioMed Central Mol. Biol.* 5:13, 2004.)

Tabela 6.1 Uma amostragem de genes de início imediato^a

Nome do gene	Localização do produto gênico	Função do produto gênico
<i>fos</i> ^b	núcleo	componente de AP-1 TF
<i>junB</i>	núcleo	componente de AP-1 TF
<i>egr-1</i>	núcleo	dedo de zinco TF
<i>nur77</i>	núcleo	relacionado a receptores esteróides
<i>Srf-1</i> ^c	núcleo	TF
<i>myc</i>	núcleo	bHLH TF
β -actina	citoplasma	citoesqueleto
γ -actina	citoplasma	citoesqueleto
tropomiosina	citoplasma	citoesqueleto
fibronectina	extracelular	matriz extracelular
transportador de glicose	membrana plasmática	importação de glicose
JE	extracelular	citocina
KC	extracelular	citocina

^aO número total de genes de início imediato distintos está estimado em 50 a 100.

^bA expressão de um grupo de genes relacionados a *fos* também é induzida como IEGs. Estes incluem *fosB*, *fra-1* e *fra-2*.

^c*Srf* é um TF que se liga aos promotores de outros genes imediatos como *fos*, *fosB*, *junB*, *erg-1* e *erg-2*, *nur77* e genes de citoesqueleto como actinas e miosinas.

Adaptada, em parte, de H.R. Herschman, *Annu. Ver. Biochem.* 60:381-319, 1991; e de B.H. Cochran, em R. Grzanna e R. Brawn (eds.), *Activation of Immediate Early Genes by Drugs of Abuse*. Rockville, MD: National Institutes of Health, 1993, pp. 3-24.

genes *myc*, *fos* e *jun*, que foram originalmente identificados a partir da sua associação com retrovírus transformantes. Além disso, outros genes de início imediato codificam proteínas que são fatores de crescimento secretados (“citocinas”) ou ajudam a construir o citoesqueleto celular.

Os níveis de mRNA de *myc* demonstraram um aumento gradual após a adição de mitógeno e um rápido colapso após a remoção do mitógeno. Além disso, a própria proteína Myc é reciclada rapidamente, tendo uma **meia-vida** ($T_{1/2}$) de apenas 25 minutos. Tais observações indicaram que os níveis de proteína Myc servem como marcador ou indicador intracelular da quantidade de mitógenos presentes no espaço extracelular em proximidade.

Além disso, podemos notar que a atividade de Myc operando como uma proteína sinalizadora deriva, em grande parte, das significativas mudanças na sua concentração no núcleo celular. Isso contrasta fortemente com o comportamento de proteínas citoplásmicas transdutoras de sinal como Ras e Src. Estas respondem a sinais mitogênicos ao submeterem-se a alterações estruturais não-covalentes e covalentes em vez de exibir aumentos significativos na concentração. Tal diferença é refletida pelas modificações que ocorrem quando os genes *myc*, *ras* e *src* normais são convertidos em oncogenes: os *níveis* de proteína Myc tornam-se desregulados (sendo expressos constitutivamente em vez de serem modulados em resposta a sinais fisiológicos), enquanto as *estruturas* das proteínas Ras e Src passam por alterações sem que haja aumento na sua quantidade.

Dentro de uma hora após o aparecimento dos mRNAs dos genes de início imediato, uma segunda onda de indução gênica ocorreu. Significativamente, a indução destes **genes de início tardio** foi consideravelmente bloqueada pela presença de cicloeximida, indicando que sua expressão dependia, de fato, da síntese protéica *de novo* (Figura 6.3). (Na verdade, a expressão dos genes de início tardio parece depender de fatores de transcrição que são sintetizados na onda inicial de expressão dos genes de início imediato.)

A adição de fatores de crescimento às células quiescentes demonstrou provocar outras modificações na fisiologia celular além da rápida indução de genes nucleares. Após exposição ao soro, a taxa de síntese protéica celular aumenta significativamente, sendo alcançada a partir da ativação funcional das proteínas que capacitam ribossomos a iniciar a tradução de mRNAs celulares. Alguns fatores de crescimento demonstraram induzir mobilidade em células, como

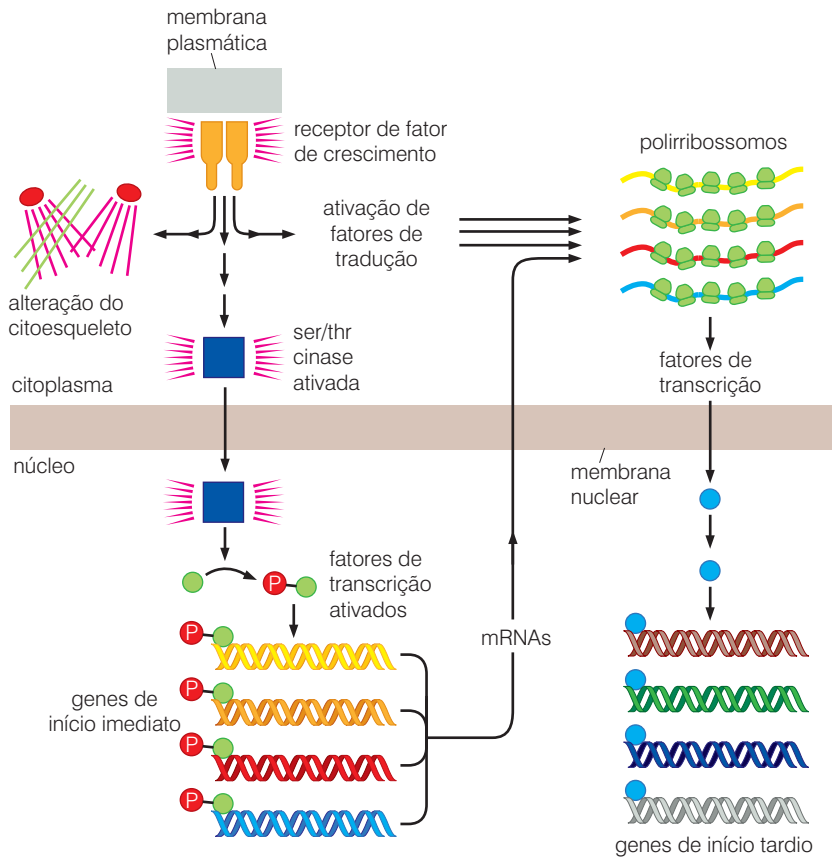
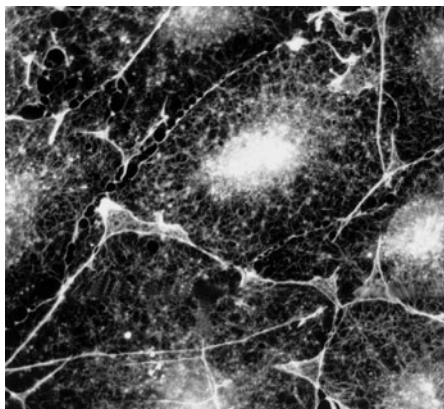


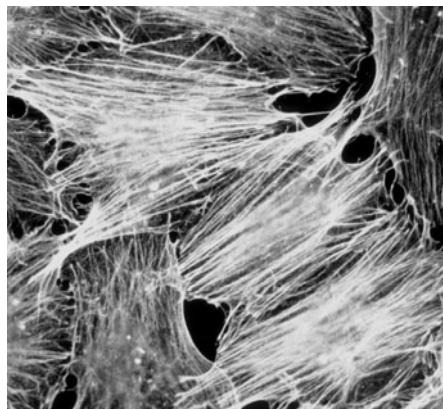
Figura 6.3 Genes de início imediato vs. tardio As profundas modificações na fisiologia celular após a aplicação de fatores de crescimento mitogênicos associados ao soro em uma célula indicam que receptores de fatores de crescimento podem liberar um diverso espectro de sinais bioquímicos, uma vez tendo sido ativados pela ligação do ligante. A transcrição de alguns genes (genes de início imediato) é observada dentro de minutos de estimulação por fator de crescimento (*esquerda inferior*), enquanto a transcrição de outros (genes de início tardio) ocorre com um atraso, uma vez que necessita da síntese de fatores de transcrição (*direita inferior*).

indicado pelo movimento no fundo de placas de Petri. Outros podem provocar uma reorganização das fibras de actina que auxiliam na construção do citoesqueleto celular – a armação que define o formato celular (Figura 6.4). Subseqüentemente, muitos fatores de crescimento foram descobertos por prover sinais de sobrevivência às células, protegendo-as, assim, da ativação inadvertida do programa de suicídio celular conhecido como apoptose.

Essas respostas diversificadas indicavam que uma variedade de distintos sinais bioquímicos irradiava dos receptores de fator de crescimento ativados por ligante, e que tais sinais direcio-



– soro



+ soro

células Swiss 3T3 confluentes

Figura 6.4 Alterações no formato celular induzidas pelo soro Da mesma maneira que muitos outros tipos celulares, células Swiss 3T3 de camundongo soro-restritas passam por profundas modificações no seu citoesqueleto de actina após estimulação por soro. Em adição, a estimulação por soro, majoritariamente mediada pelo fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF), também induz consideravelmente um aumento na mobilidade celular (*não-demonstrado*). (Cortesia de A. Hall.)

Barra lateral 6.1 Respostas transcricionais a mitógenos não fornecem indicações da expressão gênica em células em crescimento contínuo A lógica simples ditaria que as respostas transcricionais observadas logo após estimulação por fator de crescimento de uma célula soro-restrita podem ser usadas para prever o estado transcricional de células em que ocorre sinalização mitogênica continuamente devido à exposição progressiva a fatores de crescimento. Tal sinalização também parece operar em células cancerígenas, nas quais certas oncoproteínas liberam sinais mitogênicos continuamente. Como consequência, o espectro de genes de início imediato e tardio induzidos dentro da primeira hora de estimulação por fator de crescimento deve também ser expressa continuamente e em uma alta taxa em células transformadas.

Na verdade, alguns genes que são membros dos grupos de expressão de genes de início imediato e tardio são expressos em altos níveis em células cancerígenas, enquanto outros não. Essa discordância deriva das operações de controles negativos de retroalimentação que forçam o desligamento de alguns genes logo após terem sido expressados. Por exemplo, a expressão do gene *fos*, um proto-oncogene, aumenta rapidamente em resposta a estimulação por soro, chegando a um máximo, e então declina dramaticamente em cerca de uma hora após estimulação inicial por soro (veja a Figura 6.2, por exemplo). Esse desligamento se deve à habilidade da proteína Fos, uma vez sintetizada, em agir como um repressor da síntese de mais mRNA de *fos*. Muitos outros mecanismos de retroalimentação negativa operam para garantir que muitas das respostas bioquímicas iniciais incitadas por fatores de transcrição operem apenas transientemente após exposição inicial de células a esses fatores estimuladores de crescimento.

navam-se a um diverso espectro de alvos celulares. Alguns deles pareciam ser diretamente canalizados para o núcleo, onde alterariam programas de expressão gênica, enquanto outros estavam claramente direcionados a alvos citoplasmáticos, incluindo a maquinaria de síntese protéica e as proteínas que organizam a estrutura do citoesqueleto.

Uma compreensão mais clara de como essas cascatas de sinalização operam era muito relevante para a questão do câncer: se fosse verdade que algumas oncoproteínas inundam células com uma carga contínua de sinais mitogênicos (Capítulo 5), então o estado transformado de células cancerígenas poderia representar perfeitamente uma versão exagerada das respostas que células normais exibem após exposição a fatores de crescimento. Na verdade, muitos dos traços de células cancerígenas podem de fato ser gerados devido às respostas das células a esses fatores (Barra lateral 6.1).

6.2 A proteína Ras está no meio de uma complexa cascata de sinalização

As distintas respostas de células a fatores de crescimento representaram um desafio àqueles interessados na transdução de sinal intracelular, já que quase nada era conhecido sobre a organização e função dos canais comunicantes operando na célula. No período de uma década (de 1980), esses circuitos foram lentamente sendo montados, como um “quebra-cabeças”. As pistas vieram de muitas fontes. A história começou com Ras e então movimentou as cascatas de sinalização até que os elos nas correntes de sinalização foram finalmente conectados um ao outro.

Os avanços na bioquímica de Ras, que discutimos no capítulo anterior (Seção 5.9), pareceram explicar bastante sobre como ela opera como um interruptor binário, mas não proveu nenhum direcionamento quanto ao seu contexto – como essa proteína é conectada ao circuito completo de sinalização. De fato, permaneceu possível que a proteína Ras funcionasse em uma rota de sinalização que era independente daquela controlada por fatores de crescimento e seus receptores.

No final, a solução para o problema Ras veio de um lugar totalmente inesperado. A genética do desenvolvimento ocular na mosca-das-frutas, *Drosophila melanogaster*, revelou uma série de genes cujos produtos eram essenciais para o desenvolvimento normal dos omatídios, as

unidades de sensibilidade à luz que formam o olho composto. Um gene importante aqui envolvido veio a ser chamado de *sevenless*; na sua ausência, a sétima célula em cada omatídio não era formada (Figura 6.5). Após a clonagem e sequenciamento, o gene *sevenless* foi caracterizado por codificar uma proteína com as características estruturais do receptor EGF.

Além disso, outras mutações mimetizavam a mutação *sevenless*. Testes de complementação genética revelaram que tais mutações afetavam genes cujos produtos operam *downstream* de *sevenless*, aparentemente em uma cascata de transdução de sinal linear. Uma dessas proteínas *downstream* era codificada por um gene que foi nomeado *son of sevenless* ou simplesmente *sos*. O exame minucioso da proteína Sos mostrou que ela está relacionada a proteínas conhecidas de bioquímica de levedura envolvidas na indução de troca nucleotídica por proteínas G (ligação nucleotídica de guanina), como Ras. As proteínas de levedura, freqüentemente chamadas de fatores de troca do nucleotídeo guanina (GEFs), eram conhecidas por induzir proteínas G para liberar seus GDPs ligados, criando, assim, espaço para a entrada de GTPs (veja a Figura 5.30). A consequência foi uma ativação dessas proteínas G de sua configuração de sinal inativa para ativa. Este foi precisamente o efeito que Sos exerceu nas proteínas Ras (Figura 6.6). Portanto, Sos era o tão procurado estimulador *upstream* que impulsionou Ras à sua configuração ativa, e um novo componente crítico pôde ser colocado no esquema de regulação de Ras.

Logo outros intermediários na cascata de sinalização foram descobertos. Dois desses, Shc (pronuncia-se *shick*, em inglês) e Grb2 (pronuncia-se *grab two*, em inglês), foram descobertos mediante uma triagem genética e bioquímica por proteínas que interagem com receptores fosforilados ou peptídeos derivados. Tornou-se aparente que tais proteínas funcionam como adaptadores, formando pontes físicas entre receptores de fatores de crescimento e Sos; essas proteínas de ligação serão discutidas com maior detalhe posteriormente. Uma terceira proteína adaptadora, denominada Crk (pronuncia-se *crack*, em inglês), foi identificada como sendo a oncoproteína codificada pelo vírus de sarcoma aviário CT10.

Tais descobertas demonstraram as origens consideravelmente antigas dessa rota de sinalização, que já era bem desenvolvida no ancestral comum de todos os metazoários contemporâneos que viveram há mais de 600 milhões de anos. Uma vez posicionados, os componentes essenciais dessa cascata permaneceram relativamente intactos nas células de organismos descendentes. De fato, os componentes protéicos individuais dessas cascatas têm estado tão conservados que, em muitos casos, os componentes protéicos das células de um filo (cordados, por exemplo) pode ser trocado com aqueles de outro (artrópodes, por exemplo) para reconstituir uma rota de sinalização funcional.

Reunidos, os dados genéticos e bioquímicos desses filios animais distantemente relacionados poderiam ser combinados em um esquema que sugerisse uma cascata de sinalização linear organizada da seguinte forma: receptor de tirosina cinase? Shc? Grb2? Sos? Ras. Enquanto esta cascata provia o esboço de um canal de sinalização, dava pouco esclarecimento sobre as interações bioquímicas que possibilitavam a essas diversas proteínas trocar sinais uma com a outra.

6.3 A fosforilação de tirosina controla a localização e, portanto, as ações de muitas proteínas sinalizadoras citoplasmáticas

Entre as principais questões bioquímicas que permaneceram sem resposta, provavelmente as mais críticas eram as ainda misteriosas ações das cinases carregadas por muitos receptores de

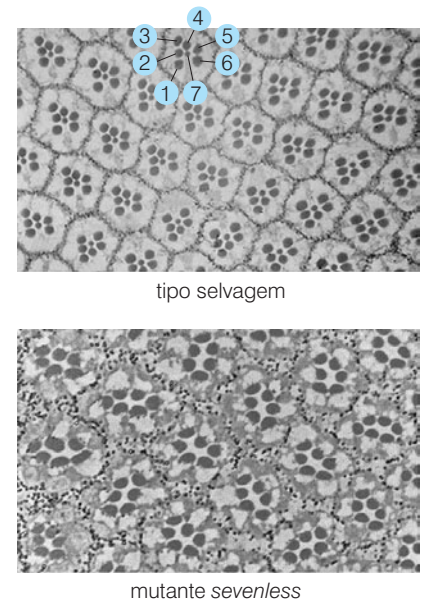


Figura 6.5 Estrutura do olho de mosca O estudo das unidades de sensibilidade à luz no olho de *Drosophila melanogaster* – os omatídios (painel superior) – revelou que cada omatídio é formado de uma série de sete células, com seis circundando externamente uma sétima central, como pode ser observado nesta micrografia eletrônica (numeração no topo central). Uma mosca carregando a mutação no gene que veio a ser chamado de *sevenless* produziu omatídios carecendo da sétima célula central (painel inferior). Posteriormente, descobriu-se que *sevenless* codificava um homólogo do receptor de fator de crescimento epidermal (EGF). (Cortesia de E. Hafen.)

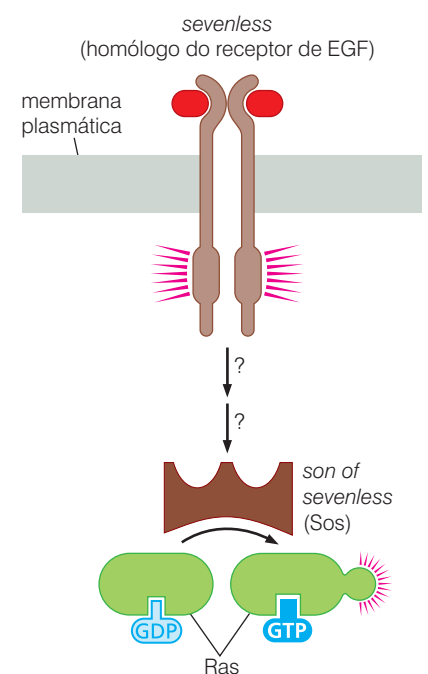


Figura 6.6 *Son of sevenless* Estudos genéticos do desenvolvimento de olho de *Drosophila* revelaram outro gene cujo produto parecia estar localizado *downstream* de *sevenless* (Figura 6.5) em uma cascata de sinalização e especificava um GEF (*marrom*), capaz de ativar a proteína Ras. Esse gene foi nomeado *son of sevenless* ou simplesmente *sos*.

fator de crescimento. Será que a fosforilação desses receptores nos resíduos de tirosina era crítica para sua habilidade em sinalizar ou era apenas uma distração? E se essa fosforilação era importante, como ela poderia ativar o complexo circuito de sinalização que estava *downstream*?

Dois mecanismos alternativos pareciam plausíveis. O primeiro predizia que um receptor de tirosina cinase associado fosforilava uma série de proteínas-alvo no citoplasma. Tal modificação covalente alteraria a *conformação* tridimensional das proteínas (ou seja, sua *estereoquímica*), posicionando, assim, cada uma delas em um estado de sinalização ativa que lhes permitia transferir sinais a uma parceira localizada um passo abaixo em uma cascata de sinalização. Esse modelo implicava, entre outras coisas, que a fosforilação da própria molécula receptora era de importância secundária à sinalização.

Segundo o modelo alternativo, a fosforilação da cauda citoplásmica de um receptor após a ligação do fator de crescimento afetava a *localização física* de suas parceiras de sinalização *downstream* sem necessariamente alterar sua atividade intrínseca. Uma vez relocadas a novos sítios no citoplasma, as parceiras *downstream* poderiam então seguir com sua tarefa de emitir sinais a outros alvos na célula.

Como visto, o segundo modelo, envolvendo a realocação protéica, provou-se mais importante. Uma melhor percepção surgiu a partir da análise da detalhada estrutura da proteína Src. Pesquisadores notaram três diferentes domínios de sequência de aminoácidos, cada sequência sendo encontrada em Src e em uma série de outras proteínas não-relacionadas. Essas sequências, chamadas domínios de homologia Src 1, 2 e 3 (SH1, SH2 e SH3), proveram a chave para o “quebra-cabeças” de sinalização de receptor (Figura 6.7).

O domínio SH1 de Src representa seu domínio catalítico, e, de fato, domínios e sequência similares estão presentes em todos receptores de tirosina cinase, assim como nos outros não-receptores de tirosina cinase que são configurados como Src. Essa relação sequencial compartilhada suporta a idéia de uma origem evolutiva comum de todas essas cinases.

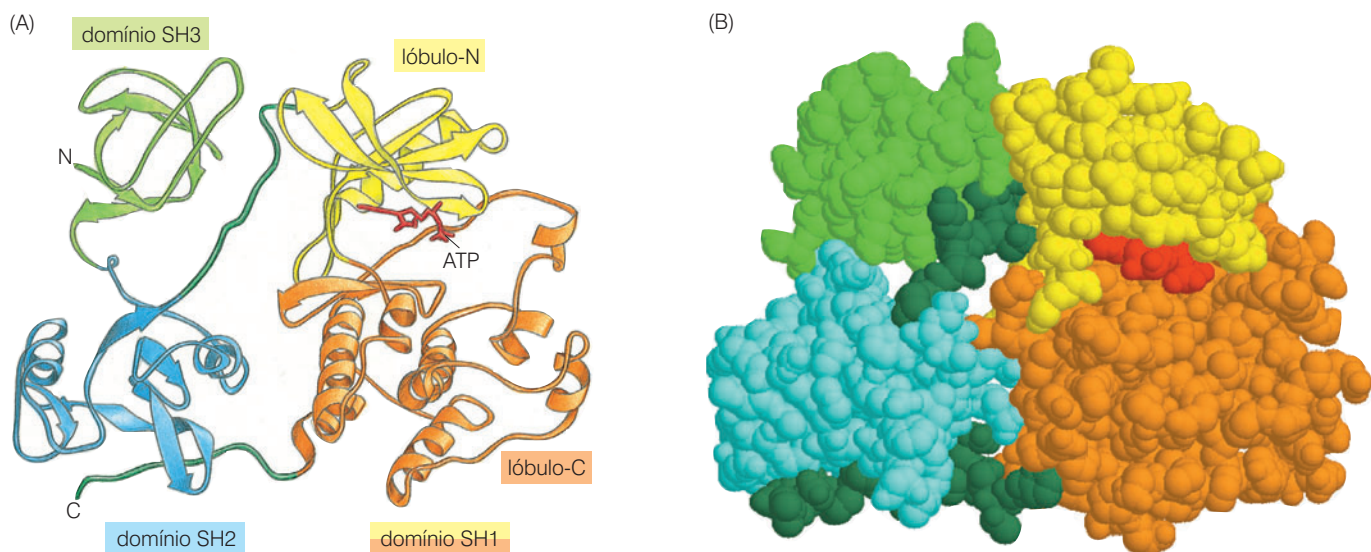


Figura 6.7 Estrutura do domínio da proteína Src. Análises de cristalografia de raios X da proteína Src revelaram três distintos domínios estruturais que também estão presentes em um grande número de outras proteínas. (A) A estrutura detalhada de Src está apresentada neste diagrama de fitas, em que os domínios helicoidais indicam hélices- α , enquanto as fitas achatadas indicam folhas β pregueadas. Da mesma forma que muitas outras proteínas cinases subsequentemente analisadas, o domínio catalítico SH1 aparenta ser composto de dois domínios (*direita*), rotulados

domínios cinase lóbulo-N e C (*amarelo, laranja*). Entre esses lóbulos está o sítio de ligação do ATP onde ocorre a catálise (*figura vermelha em bastão*). Os domínios SH2 e SH3 (*azul, verde-claro*) estão à esquerda e estão envolvidos no reconhecimento de substrato e na regulação da atividade catalítica. Sequências conectoras estão apresentadas em *verde-escuro*. (B) Modelo de espaço preenchido de Src. (A, de B. Alberts et al., *Molecular Biology of the Cell*, 4th ed. New York: Garland Science, 2002; B, cortesia de M.J. Eck, veja W. Xu et al., *Mol. Cell* 3: 629-638, 1999.)

Uma hábil investigação bioquímica conduzida no final da década de 1980 revelou o papel do domínio SH2 presente em Src e outras proteínas sinalizadoras. Esse domínio estrutural relativamente pequeno, de cerca de 100 resíduos de aminoácidos (Figura 6.8), atua como um “receptor” intracelular. O “ligante” para o receptor SH2 é uma pequena sequência oligopeptídica que contém tirosina fosforilada e uma sequência oligopeptídica específica de 3 a 6 resíduos que flanqueia a fosfotirosina em seu lado C-terminal.

Logo, tornou-se aparente que existem dezenas de domínios SH2 distintos, cada um carregado por uma proteína diferente e tendo uma afinidade por uma sequência oligopeptídica contendo fosfotirosina específica que funciona como seu ligante. As especificidades de sequência de um número substancial de grupos SH2 já foram catalogadas. Estima-se que o genoma humano codifique pelo menos 117 distintos grupos de SH2, cada um constituindo um domínio de uma proteína maior e tendo, aparentemente, uma afinidade por ligar-se a uma fosfotirosina particular junto com uma sequência oligopeptídica flanqueadora.

Em geral, um domínio SH2 possibilita que a proteína que o carrega se associe a uma parceira protéica que esteja apresentando uma fosfotirosina específica mais uma sequência de aminoácidos flanqueadora, formando assim um complexo físico entre essas duas proteínas. Algumas proteínas que carregam SH2 não carregam nenhuma atividade enzimática. Outras, em adição a seus domínios SH2, carregam sítios catalíticos bastante diferentes da atividade tirosina cinase (TK) presente na própria Src. Por exemplo, uma forma de fosfolipase C carrega um domínio SH2, da mesma forma que a subunidade p85 da enzima fosfatidilinositol 3 cinase (PI3K). A proteína SHP1, que será brevemente discutida, carrega um domínio SH2 ligado a um domínio catalítico de **fosfatase**, ou seja, uma atividade enzimática que remove grupos fosfato, revertendo assim as ações de cinases.

Tais achados indicam que os domínios catalíticos das várias proteínas e seus grupos SH2 funcionam como módulos estruturais independentes. Esses módulos têm sido agrupados em diversas combinações pela evolução. O grupo SH2 originado por cada uma dessas proteínas lhe permite tornar-se localizada em certos sítios na célula, especificamente aqueles sítios que contêm proteínas particulares que carregam fosfotirosinas às quais proteínas contendo SH2 podem se grudar.

As descobertas sobre os grupos SH2 finalmente resolveram o quebra-cabeças de como receptores de tirosina cinase são capazes de emitir sinais. A história está esquematicamente ilustra-

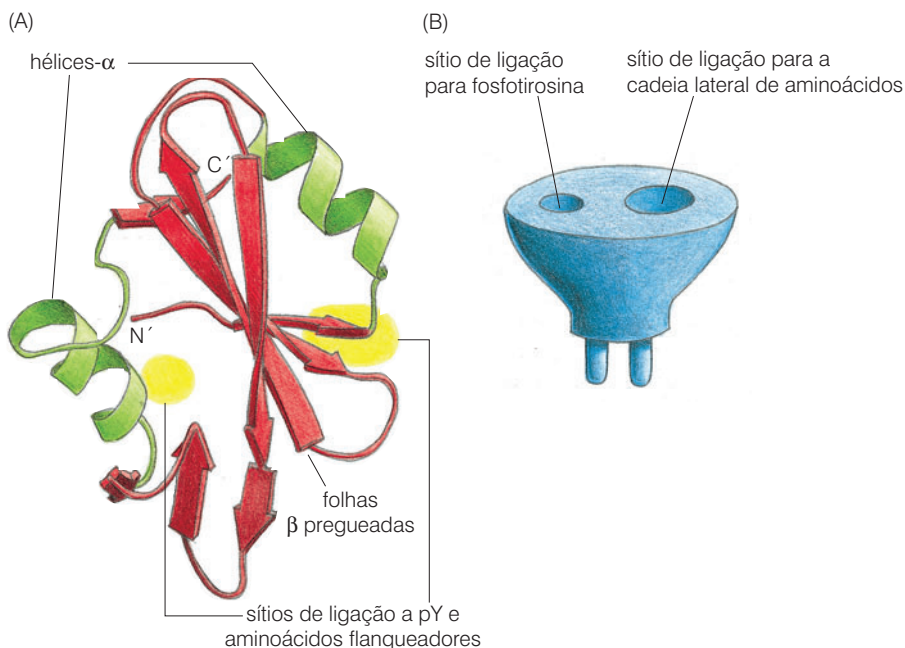


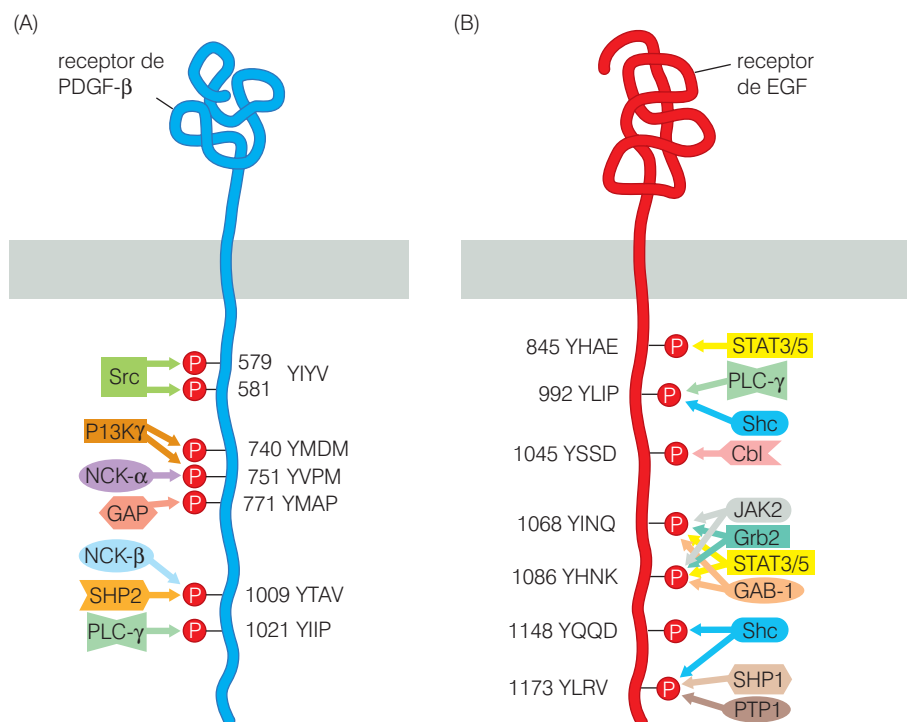
Figura 6.8 Estrutura e função dos grupos SH2 (A) Este diagrama de fitas apresenta a estrutura tridimensional de um domínio SH2 típico obtido a partir de cristalografia de raios X. O domínio SH2 é visto em uma orientação diferente daquela vista na Figura 6.7. Um domínio SH2 típico é composto de cerca de 100 aminoácidos e é formado a partir de um par de folhas β pregueadas antiparalelas (vermelho) cercado por um par de hélices-α (verde). Os sítios de interação pelo domínio SH2 com seu “ligante” – um peptídeo contendo uma fosfotirosina (pY) – estão indicados por pontos amarelos. (B) Como indicado no desenho esquemático, o domínio SH2 funciona como um encaixe molecular: ele reconhece tanto uma fosfotirosina como as cadeias laterais de aminoácidos que flanqueiam essa fosfotirosina na sua extremidade C-terminal. Esses resíduos de aminoácidos flanqueadores determinam a especificidade de ligação, ou seja, as identidades dos oligopeptídeos fosfotirosinados particulares que são reconhecidos e ligados por um domínio SH2 particular. (A, baseada em dados de G. Waksman et al., *Cell* 72: 779-790, 1993; B, de B. Albert et al., *Molecular Biology of the Cell*, 4th ed. New York: Garland Science, 2002.)

da na Figura 6.9. Como consequência da transfosforilação induzida pela ligação, uma molécula receptora, como o receptor de EGF, irá adquirir e apresentar um característico espectro de resíduos de fosfotirosina em sua cauda citoplásmica; da mesma forma, o receptor de PDGF apresentará seu próprio espectro de fosfotirosinas em sua cauda citoplásmica. A identidade singular de cada resíduo de fosfotirosina originado por essas caudas é ditada pela sequência de resíduos de aminoácidos flanqueando a fosfotirosina na sua extremidade C-terminal. Essas fosfotirosinas tornam-se atrativos sítios residentes para várias proteínas citoplásmicas contendo SH2, especificamente proteínas que em geral são encontradas na porção solúvel do citoplasma (o **citossol**) e estão, portanto, livres para movimentar-se de uma localidade para outra no citoplasma. Como consequência, logo após tornar-se ativado pela ligação do ligante, um receptor de fator de crescimento torna-se decorado com um conjunto específico dessas proteínas parceiras contendo SH2 que são atraídas a suas várias fosfotirosinas.

Por exemplo, uma forma ligante-ativada do receptor de PDGF atrai Src, PI3K, Ras-GAP (que estimula atividade GTPase Ras: veja a Barra lateral 5.11), SHP2 (fosfatase de tirosina 2 contendo SH2) e fosfolipase C- γ (PLC- γ). Cada uma dessas proteínas carrega ao menos um domínio SH2, e todas elas aglomeram-se no PDGF-R após sua cauda citoplásmica e um curto segmento no meio do seu domínio cinase (chamado de “inserto cinase”) tornarem-se tirosina-fosforilados. Uma vez atadas a PDGF-R, algumas dessas proteínas contendo SH2 tornam-se substratos para fosforilação de tirosina pela cinase de PDGF-R. (Permanece obscuro se todas essas proteínas contendo SH2 e mesmo outras podem se ligar simultaneamente a uma única molécula receptora de PDGF ativada por ligante.)

A diversidade bioquímica dessas proteínas associadas nos provê pelo menos uma solução para a questão de como um fator de crescimento é capaz de produzir uma diversidade de respostas bioquímicas e biológicas de uma célula: cada uma delas controla sua própria cascata de sinalização *downstream*, e cada uma dessas cascatas, por sua vez, influencia um aspecto diferente do comportamento celular. Ao grudarem-se a uma molécula receptora, essas proteínas contendo SH2 são levadas a ativar suas respectivas cascatas. Algumas delas funcionam de forma a ativar alças de retroalimentação negativa que podem acabar desligando a sinalização do receptor (Barra lateral 6.2).

Figura 6.9 Atração de proteínas transdutoras de sinal por receptores fosforilados (A) Este diagrama esquemático de uma molécula do receptor de PDGF- β , que omite seu domínio tirosina cinase, revela um grande número de resíduos de tirosina na porção C-terminal do receptor que é submetida a fosforilação após ligação do ligante e ativação do receptor. (As posições destes resíduos de tirosina na cadeia polipeptídica do receptor estão indicadas pelos números.) Estão listadas à esquerda sete distintas proteínas citoplásmicas, cada uma podendo ligar-se a uma ou mais das fosfotirosinas do receptor de PDGF- β via seu(s) domínio(s) SH2. A sequência de aminoácidos de cada uma dessas fosfotirosinas está indicada por um código de aminoácidos de letra única. Como indicado, os três resíduos de aminoácidos que flanqueiam cada resíduo de tirosina (Y) em sua extremidade C-terminal definem o exclusivo sítio de ligação reconhecido pelos vários domínios SH2 carregados por essas sete proteínas associadas. (B) Similarmente, uma constelação de fosfotirosinas pode ser formada após o receptor de EGF ligar-se ao seu ligante, geralmente formando heterodímeros com a proteína receptora HER2. Entretanto, o espectro de proteínas contendo SH2 associadas ao EGF-R é bastante diferente, permitindo que esse receptor ative um grupo diferente de rotas sinalizadoras *downstream*. (A, adaptada de T. Pawson, *Adv. Cancer Res.* 64: 87-110, 1994; B, adaptada de R. Sordella et al., *Science* 305: 1163-1167, 2004.)



Barra lateral 6.2 Uma molécula contendo SH2 determina resultados de competição Olímpica

Uma das parceiras contendo SH2 dos receptores de tirosina cinase é uma fosfotirosina fosfatase (PTP), uma enzima que remove o grupo fosfato da fosfotirosina. Uma vez ligada via seu grupo SH2 a um receptor de tirosina fosforilado ativado por ligante, essa particular fosfatase, denominada SHP1, começa a arrancar os grupos fosfato nos resíduos de tirosina que permitiram que o receptor atraia outras parceiras sinalizadoras *downstream*. Assim, uma enzima como SHP1 cria uma alça de retroalimentação negativa para encerrar qualquer futura descarga do receptor. Na verdade, a fosfatase SHP1 é responsável por encerrar a sinalização de uma variedade de receptores, como o receptor para fator de crescimento de eritropoietina (EPO), que normalmente responde a EPO ao desencadear **eritropoiese** – formação de células vermelhas sanguíneas (descrita na Figura 6.22).

Alguns indivíduos herdam um gene receptor mutante que codifica um receptor EPO que carece do sítio de ancoragem usual para a fosfatase SHP1. Em indivíduos cujas células expressam esse receptor mutante, o controle de retroalimentação negativa defeutivo resultante conduz a um receptor EPO hiperativo e, então, a níveis acima do normal de células vermelhas e, portanto, aumenta a capacidade de transporte de oxigênio no seu sangue. No caso de muitos membros de uma família finlandesa com esse defeito genético herdado, a condição parece ter desempenhado um papel-chave nas suas conquistas Olímpicas no esqui *cross-country*! (É interessante salientar que a expressão de SHP1 é interrompida em muitas leucemias e linfomas não-Hodgkin; isso permite que múltiplas moléculas receptoras de mitógenos descarreguem excessivamente nas células tumorais.)

Uma vez que os domínios citoplásmicos dos receptores de tirosina cinase estão localizados próximos da superfície interna da membrana plasmática, as proteínas parceiras contendo SH2 atraídas ao receptor são trazidas para perto da membrana plasmática e, assim, perto de outras moléculas que já estão, por suas próprias razões, ligadas à membrana. Essa justaposição íntima permite que várias proteínas contendo SH2 interajam diretamente com as proteínas e fosfolípidos associados à membrana, gerando, assim, uma variedade de sinais bioquímicos que pode ser transmitida a várias cascatas de transdução de sinal *downstream*.

Por exemplo, a proteína ativadora de GTPase Ras (Ras-GAP), tendo se ligado a um receptor fosforilado, está ligada em íntima proximidade a proteínas Ras, muitas das quais estão permanentemente ancoradas à membrana plasmática via suas caudas lipídicas C-terminais. Isso permite que Ras-GAP interaja com moléculas Ras próximas, estimulando-as a hidrolisar suas GTPs ligadas, fazendo, assim, com que elas se convertam de um estado de sinalização ativo para um inativo.

Similarmente, quando fosfatidilinositol 3-cinase (PI3K) torna-se ligada próximo à membrana plasmática, ela é capaz de fosforilar lipídeos incrustados na membrana; retornaremos a PI3K e seu mecanismo de ação na Seção 6.6. Um outro exemplo é provido pela PLC- γ , que, quando justaposta à membrana plasmática via ligação ao receptor, é capaz de clivar um fosfolípido associado à membrana [fosfatidilinositol (4,5)-difosfato, ou PIP₂] em dois produtos, cada qual tendo seus potentes poderes de sinalização. A questão aqui é que muitas reações tornam-se possíveis (ou podem prosseguir a taxas muito mais altas) quando enzimas e seus substratos são intimamente agrupados a partir da ligação dessas enzimas a receptores fosforilados.

O domínio SH3, o terceiro dos motivos sequenciais presentes em Src (veja a Figura 6.7), liga-se especificamente a certos domínios sequenciais ricos em prolina em proteínas parceiras; essas sequências ricas em prolina passam então a servir como ligantes dos domínios SH3. (Um pequeno subconjunto de grupos de SH3 parece reconhecer ligantes de uma estrutura diferente.) Os domínios SH3 são uma invenção relativamente antiga (aparentemente originada há mais de 1,5 milhão de anos), visto que existem pelo menos 28 deles presentes nas várias proteínas da levedura *S. cerevisiae*. O domínio SH2, em contraposição, aparenta ser de origem mais recente, tendo sido inventado possivelmente na mesma época em que a fosforilação de tirosina se tornou muito utilizada – talvez há 600 milhões de anos, quando surgiram os metazoários (Figura 6.10A).

No caso específico do domínio SH3 de Src, não há evidência que ele seja utilizado para reconhecer e ligar-se a certos substratos que portam domínios ricos em prolina e, uma vez ligados a Src, podem então ser fosforilados pela atividade cinase de Src. Além disso, outras evidências apontam para um domínio de ligação rico em prolina na própria Src, ao qual domínios SH3 de Src se associam, criando uma ligação intramolecular. A partir de análises da sequência do genoma humano, foram descobertos 253 domínios SH3 distintos, cada um sendo parte de uma proteína maior.

Os domínios SH2 e SH3 foram os primeiros de uma série de domínios protéicos especializados a serem reconhecidos e catalogados (Figura 6.10B). Cada um deles é capaz de reconhecer e ligar uma sequência ou estrutura específica presente em uma molécula parceira. Alguns reconhecem e ligam fosfoserina e fosfotreonina em proteínas parceiras, enquanto outros se ligam a formas fosforiladas de alguns lipídeos de membrana (Tabela 6.2). Outro domínio especializado, denominado PTB, é capaz, da mesma forma que grupos SH2, de reconhecer e ligar resíduos de fosfotirosina; nesta instância, entretanto,

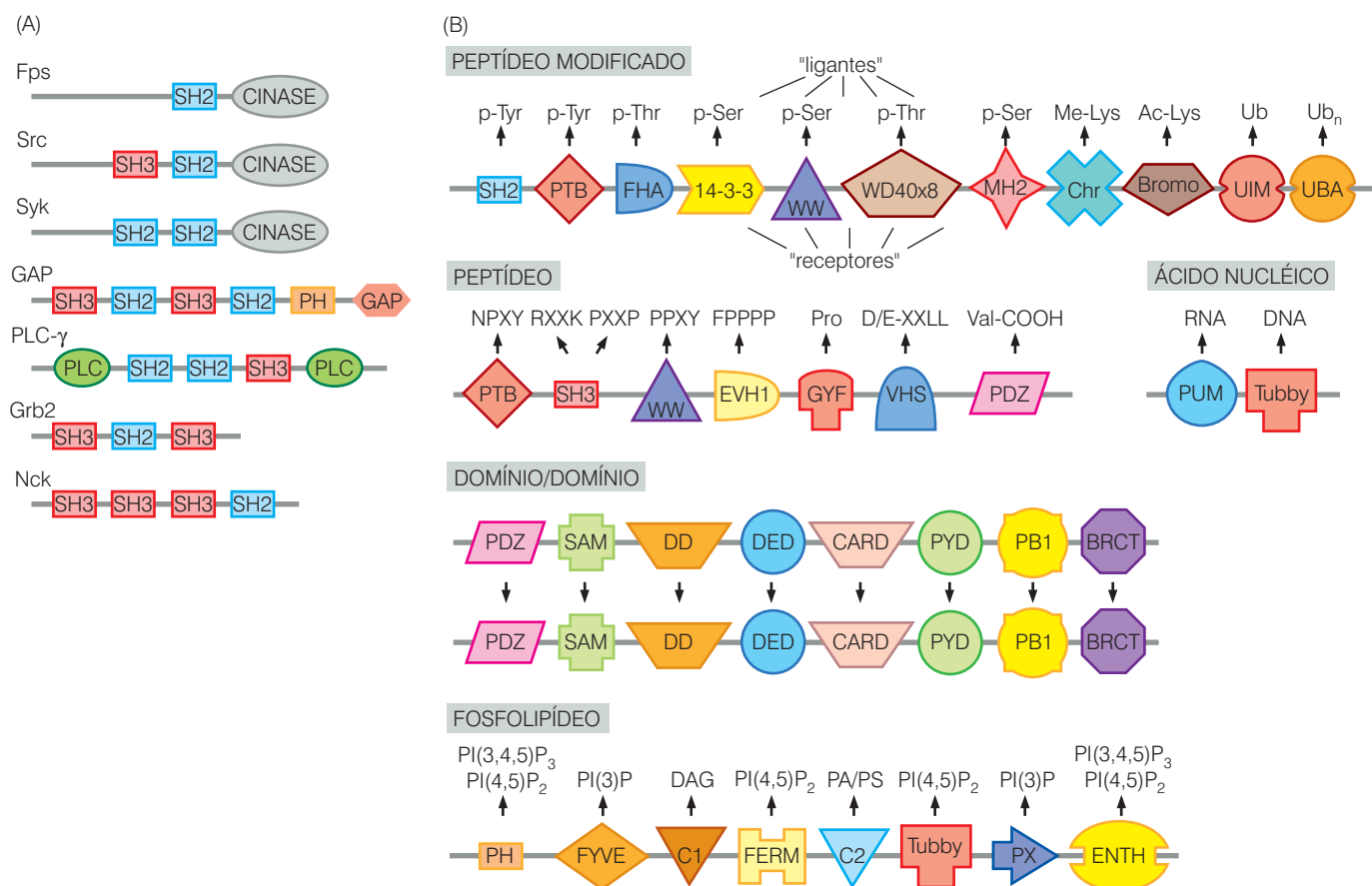


Figura 6.10 Domínios de interação protéica como unidades moduladoras da estrutura protéica. Complexos multiprotéicos específicos são formados usando domínios como SH2, SH3 e PH, que ligam fosfotirosinas, sequências ricas em prolina e PIP₃, respectivamente. Como está indicado na figura, a evolução tem manipulado esses domínios de forma modular, ligando-os a domínios catalíticos de tirosina cinase; no caso das três primeiras tirosina cinases (Fps, Src e Syk), a um domínio GAP (proteína ativadora de GTPase) ou a um domínio PLC (fosfolipase C). Na porção inferior estão apresentadas duas proteínas adaptadoras ou de "ligação" que contêm apenas domínios SH2 e SH3 e carecem de domínios catalíticos; cada um desses adaptadores serve como um ligante entre pares de outras

proteínas, uma das quais carrega uma certa fosfotirosina (ao qual um domínio SH2 pode se ligar), e a outra, um domínio rico em prolina (ao qual um domínio SH3 pode se ligar). (B) O espectro de "ligantes" moleculares que podem ser ligados a domínios "receptores" complementares para facilitar interações intermoleculares é bem maior que o indicado no painel (A). Como apresentado, uma variedade de resíduos de aminoácidos modificados, sequências peptídicas, ácidos nucleicos e fosfolipídeos podem servir como ligantes dos domínios indicados. Além disso, certos domínios ("domínio-domínio") favorecem a homodimerização de duas moléculas protéicas. (A, adaptada de T. Pawson, *Adv. Cancer Res.* 64: 87-110, 1994; B, de T. Pawson e P. Nash, *Science* 300: 445-452, 2003.)

os resíduos de aminoácidos flanqueadores na porção N-terminal da fosfotirosina definem a identidade singular do ligante de fosfotirosina.

Juntos, esses vários domínios ilustram como as linhas de comunicação de uma célula são restritas, visto que a habilidade de moléculas sinalizadoras em associar-se fisicamente de formas muito específicas a moléculas-alvo assegura que sinais sejam passados apenas a esses alvos pretendidos, e não a outras proteínas na célula. Além disso, o exame de um espectro de proteínas sinalizadoras revelou que esses vários domínios têm sido usados como módulos, sendo formados de diferentes maneiras a partir da evolução para assegurar a especificidade de uma variedade e interações intramoleculares (veja a Figura 6.10B).

A descoberta de grupos SH2 também explicou como Src, a oncoproteína original, opera em uma célula normal, e como o vírus do sarcoma de Rous reconfigurou a estrutura de Src, transformando-a em uma oncoproteína (Barra lateral 6.3).

6.4 Grupos SH2 explicam como receptores de fator de crescimento ativam Ras e adquirem especificidade de sinalização

A descoberta de grupos SH2 e seus mecanismos de ação possibilitou a resolução de uma série de importantes problemas. As respostas bioquímicas podiam agora explicar precisamente como a cascata do receptor \rightarrow Sos \rightarrow Ras opera.

A chave foi provida pela estrutura da proteína Grb2. Ela contém dois grupos SH3 e um grupo SH2. Seus domínios SH3 têm uma afinidade por duas seqüências distintas ricas em prolina presentes em Sos, enquanto sua seqüência SH2 associa-se a uma fosfotirosina presente na extremidade C-terminal de muitos receptores ativados por ligante. Como consequência, Sos, que em geral parece flutuar livremente no citoplasma, torna-se agora agarrado ao receptor a partir da ligação de Grb2 (Figura 6.12).

As análises detalhadas das estruturas de Grb2 e de proteínas similarmente configuradas (Crk, por exemplo) indicam que elas não carregam nenhum outro domínio funcional além de seus domínios SH2 e SH3. Aparentemente, essas proteínas adaptadoras não passam de “pontes” especificamente desenvolvidas para ligar outras proteínas entre si. (Uma ligação alternativa, também apresentada na Figura 6.12, pode ser obtida quando um receptor de fator de crescimento associa-se a Sos via Grb2 e Shc.)

Quando Sos se torna ancorado ao receptor via Grb2 (ou via Grb2 + Shc), ele é aproximado de proteínas Ras, que parecem estar, em sua maioria, permanentemente agarradas à face interna da membrana plasmática. Sos é então fisicamente posicionada para interagir direta-

Tabela 6.2 Domínios de ligação que são carregados por várias proteínas^a

Nome do domínio	Ligante	Exemplos de proteínas carregando este domínio
SH2	fosfotirosina	Src (tirosina cinase), Grb2 (proteína adaptadora), Shc (proteína de sustentação), SHP2 (fosfatase), Cbl (ubiquitilação)
PTB	fosfotirosina	Shc (proteína adaptadora), IRS-1 (adaptador para sinalização de insulina RTK), X11 (proteína neuronal)
SH3	rico em prolina	Src (tirosina cinase), Crk (proteína adaptadora), Grb2 (proteína adaptadora)
14-3-3	fosfosserina	Cdc25 (fosfatase CDK), Bad (regulador de apoptose), Raf (cinase ser/thr), PKC (proteínas cinases C cinase ser/thr)
Bromo	lisina acetilada	P/CAF (co-fator de transcrição), proteínas de cromatina
PH ^b	inosítídeos fosforilados	PLC- δ (fosfolipase C), Akt/PKB (cinase ser/thr), BTK

^aPelo menos 32 tipos distintos de domínios de ligação foram identificados. Esta tabela apresenta seis destes, que estão geralmente associados na transdução de sinais mitogênicos.

^bOs grupos de ligação fosfoinosítídeos incluem, em adição ao domínio PH, os domínios Fab1, YOTB, Vac1, EEA1 (FYVE), PX, ENTH, e FERM.

Barra lateral 6.3 O domínio SH2 de Src tem duas funções alternativas Temos retratado SH2 como um domínio protéico que permite que seu portador reconheça e ligue-se a outras proteínas parceiras contendo fosfotirosina, formando, assim, complexos biomoleculares. Entretanto, em tirosina cinases como Src, o grupo SH2 pode também desempenhar um papel bastante diferente. Da mesma forma que a maioria das moléculas sinalizadoras, a cinase Src em geral existe em uma configuração funcionalmente silenciosa. Ela é mantida nesse estado inativo por um domínio de regulação negativa de Src – uma seqüência polipeptídica que drapeja através do sítio catalítico de Src e bloqueia o acesso aos substratos desta cinase. O domínio obstruente (algumas vezes denominado de “alça de ativação”; veja a Figura 5.18) é mantido na sua posição, em parte, devido às ações do grupo SH2 de Src, que reconhece e liga uma fosfotirosina na posição 527 do próprio Src. Assim, esse grupo SH2 está formando uma ponte *intramolecular* em vez de *intermolecular* (Figura 6.11A).

Alguns receptores, como PDGF, podem tornar-se ativados pela ligação do ligante e apresentar fosfotirosinas em seus domínios citoplasmáticos que são também sítios atrativos de ligação para os grupos SH2 de Src. Como consequência, o grupo estável SH2 de Src quebra sua

ligação intramolecular e forma novamente uma nova ligação intermolecular com o receptor PDGF; isso resulta na adesão de Src ao receptor PDGF (Figura 6.11B). Ao mesmo tempo, a fenda catalítica da proteína Src foi liberada dos efeitos obstrutivos desse domínio de regulação negativa, e, portanto, Src pode começar a fosforilar sua própria clientela de substratos, auxiliando assim a transmissão de sinais pelo receptor PDGF (Figura 6.11C).

A oncoproteína Src especificada pelo vírus do sarcoma de Rous é uma forma mutante da proteína c-Src normal em que o domínio oligopeptídico C-terminal contendo o resíduo de tirosina 527 foi trocado por outra seqüência de aminoácidos não-relacionada. Como consequência, uma fosfotirosina nunca pode ser formada nesse sítio, e a alça inibitória intramolecular não pode formar e obstruir o sítio catalítico de Src. A oncoproteína viral (v-Src) está, portanto, liberada para descarregar constitutivamente. Um mutante Src similar, em que os seis aminoácidos C-terminais estão deletados (incluindo a tirosina 527), foi reportado em metástase de fígado de carcinomas de cólon humano. Enquanto a cinase Src é hiperativa em muitos carcinomas de colôn, este é um dos extremamente raros exemplos de uma Src mutante estruturalmente alterada em cânceres humanos.

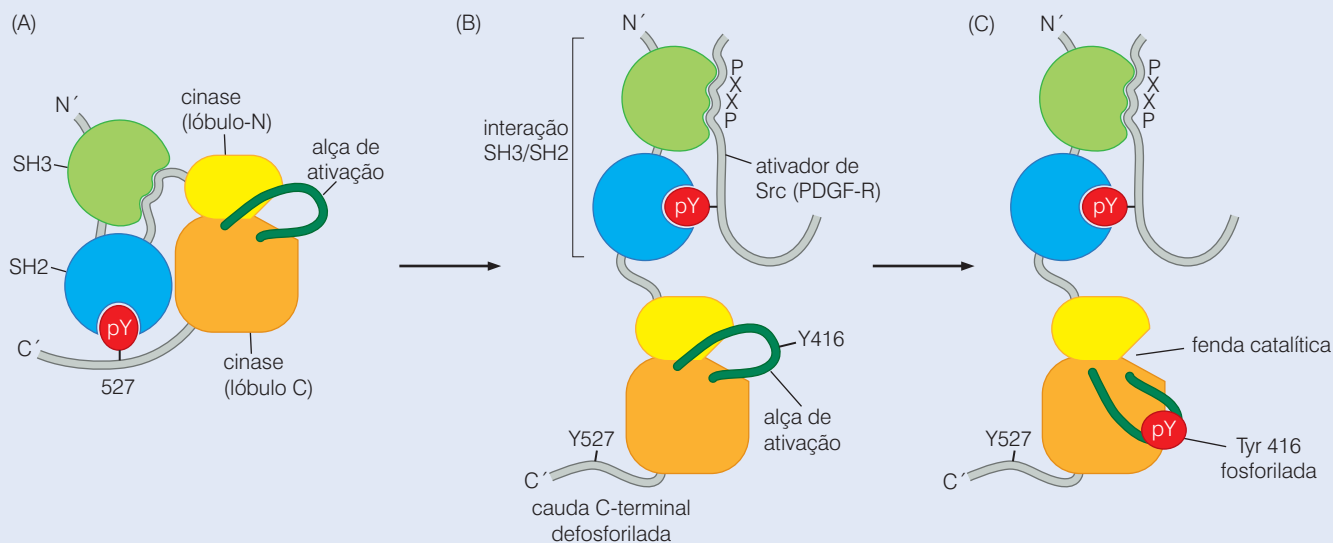


Figura 6.11 Estrutura e função de Src (A) O grupo SH2 de Src (azul) liga-se normalmente de uma forma intramolecular a um resíduo de fosfotirosina (pY) na posição 527, perto da extremidade C-terminal de Src (vermelho). Essa ligação causa a obstrução da fenda catalítica de Src, que está localizada entre o lóbulo-N e o C do domínio cinase. Ao mesmo tempo, o domínio SH3 (verde claro) liga-se a um segmento rico em prolina no lóbulo-N do domínio cinase. (B) Entretanto, quando o receptor PDGF (indicado aqui como “ativador de Src”) torna-se fosforilado, uma de suas fosfotirosinas (vermelho)

serve como ligante para o grupo SH2 de Src, causando a troca de SH2 da ligação intra para intermolecular. Concomitantemente, o grupo SH3 de Src se desliga da sua ligação intramolecular para ligar-se a um domínio rico em prolina (PXXP) no receptor. Tais mudanças colocam a fenda catalítica de Src em uma configuração que lhe possibilita descarregar. (C) Uma fosforilação final da tirosina 416 move uma alça de ativação oligopeptídica obstruente (verde-escuro) para fora do caminho da fenda catalítica, gerando a atividade total de tirosina cinase de Src. (Adaptada de W. Xu et al., *Mol. Cell* 3: 629-638, 1999.)

mente com estas moléculas Ras, induzindo-as a liberar GDPs e ligar GTPs. Essa troca do nucleotídeo guanina causa a ativação da sinalização protéica de Ras. Assim, a rota bioquimicamente definida poderia ser representada da seguinte forma:

Receptor → Grb2 → Sos → Ras

ou

Receptor → Shc → Grb2 → Sos → Ras

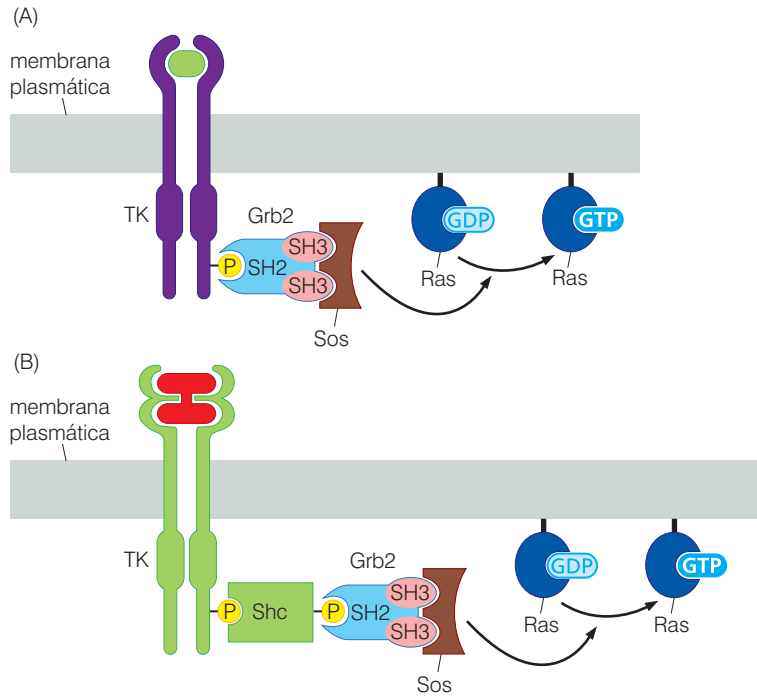


Figura 6.12 Ligações intermoleculares forjadas pelas proteínas de ligação Grb2 e Shc (A) A associação de Sos, o fator de troca de nucleotídeo de guanina (GEF) de Ras, com receptores de fator de crescimento ativado por ligante é alcançada por proteínas de ligação, como Grb2, aqui apresentada. Os dois domínios SH3 de Grb2 ligam-se a domínios ricos em prolina de Sos, enquanto seu domínio SH2 liga-se a uma fosfotirosina localizada na cauda C-terminal de um receptor. (B) Um modo alternativo de associação pode ser obtido a partir de uma colaboração entre duas proteínas de ligação, Grb2 e Shc. Grb2 utiliza seus domínios SH3 para ligar Sos e seu domínio SH2 para ligar-se a uma fosfotirosina em Shc; este último utiliza seu próprio domínio SH2 para ligar uma fosfotirosina em um receptor ativado por ligante. (Adaptada de G.M. Cooper, *Oncogenes*, 2nd ed. Boston and London: Jones and Bartlett, 1995.)

Uma vez que um grupo diversificado de proteínas sinalizadoras torna-se atraído a receptores ativados por ligantes (veja, por exemplo, a Figura 6.9), a rota Sos-Ras representa apenas uma das várias cascatas de sinalização irradiadas a partir de receptores de fator de crescimento.

6.5 Uma cascata de cinases forma uma de três importantes rotas de sinalização *downstream* de Ras

As múltiplas respostas celulares elicitadas por um fator de crescimento poderiam agora ser explicadas pelo fato de que seu receptor *cognato* (p. ex., o receptor que se liga especificamente a ele) é capaz de ativar uma combinação específica de rotas sinalizadoras *downstream*. Cada uma dessas rotas pode ser responsável por induzir, por sua vez, uma ou outra das mudanças biológicas que ocorrem após as células serem estimuladas por esse fator de crescimento em particular. Além disso, formas exageradas desta sinalização podem estar facilmente ocorrendo em células cancerígenas que passam por contínua estimulação por fator de crescimento devido a uma alça de sinalização autócrina ou a um receptor mutante ativado constitutivamente.

Entretanto, essa ramificação de rotas *downstream* não explicou como a oncoproteína Ras mutante (que representa apenas uma das múltiplas rotas *downstream* dos receptores de fator de crescimento) é capaz de evocar uma série de distintas mudanças nas células. Aqui, mais uma vez, a bioquímica da transdução de sinal proveu abordagens críticas. Sabemos agora que pelo menos três importantes cascatas de sinalização *downstream* irradiam da proteína Ras. Suas diversas ações ajudam a explicar como a oncoproteína Ras causa tantas mudanças no comportamento celular.

A disposição dessas rotas de sinalização *downstream* foi mapeada a partir de uma combinação da genética de levedura e da análise bioquímica de células de mamíferos. Essas abordagens mostraram que quando Ras liga GTP, um domínio da proteína Ras, denominado **alça efetora**, é capaz de interagir fisicamente com várias parceiras de sinalização alternativas *downstream*, que são coletivamente conhecidas como Ras *efetoras*, ou seja, as proteínas que desempenham

o real papel de Ras (Figura 6.13). Cada um desses efetores se liga de forma consideravelmente forte à alça efetora da proteína Ras na forma ligada a GTP, tendo uma pequena afinidade pela alça apresentada pela sua forma ligada a GDP.

O primeiro de tais efetores de Ras a ser descoberto foi o Raf cinase. Da mesma forma que a maioria das proteínas cinases na célula, Raf fosforila substratos protéicos nos seus resíduos de serina e treonina. Raf cinase já havia sido revelada como a oncoproteína especificada por um retrovírus murino de rápida transformação, e, de forma homóloga, por um retrovírus de galinha, muito antes da descoberta de sua associação com Raf (veja a Tabela 3.3).

A ativação de Raf por Ras depende da realocização de Raf no citoplasma. É importante lembrar que as proteínas Ras estão sempre ancoradas a uma membrana, geralmente na superfície interna da membrana plasmática, a partir de suas caudas hidrofóbicas C-terminais. Uma vez tendo ligado GTP, Ras ativada atrai e liga-se a Raf via sua alça efetora. Antes dessa associação, Raf encontra-se no citosol; posteriormente, Raf torna-se agarrada à membrana plasmática via Ras (ou, em alguns casos, a outra membrana plasmática).

A associação de Raf com Ras parece alterar a configuração tridimensional da molécula Raf cinase. Além disso, durante o período que está ancorada a Ras, Raf pode tornar-se fosforilada por cinases ainda pouco compreendidas, possivelmente incluindo Src. Então, Raf adquire poderes de sinalização ativa e prossegue fosforilando e, assim, ativando uma segunda cinase, conhecida como MEK (MAPKK). MEK é, na verdade, uma “cinase de dupla especificidade”, já que ela pode fosforilar tanto resíduos de serina/treonina como de tirosina. MEK utiliza esses poderes para fosforilar duas outras cinases, as cinases 1 e 2 reguladas por sinal extracelulares, comumente referidas como Erk1 e Erk2. Uma vez fosforiladas e ativadas, cada uma dessas Erks passa a fosforilar substratos que, por sua vez, regulam vários processos celulares, incluindo a transcrição.

Esse tipo de cascata de sinalização por cinase tem recebido o nome genérico de rota de proteína cinase ativada por mitógeno (MAPK). Na verdade, há uma série dessas cascatas de sinali-

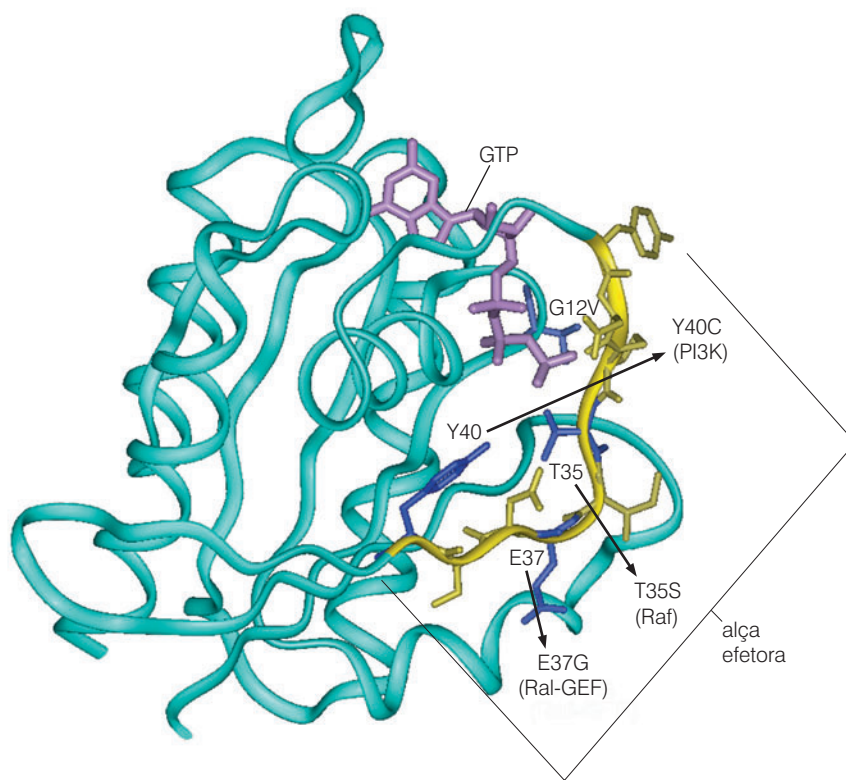


Figura 6.13 A alça efetora Ras A estrutura cristalográfica da proteína Ras, vista de um ângulo diferente da Figura 5.31, está aqui apresentada em um diagrama de fitas (verde azulado). O nucleotídeo guanina (lilás) está apresentado juntamente com seu resíduo de glicina vizinho, que, ao ser trocado por uma valina, causa inativação da atividade GTPase (G12V). A alça efetora (amarelo) interage com pelo menos três importantes efetores de Ras *downstream*. Substituições de aminoácidos (flechas) afetando três resíduos na alça efetora criam três formas alternativas da proteína Ras que interagem preferencialmente com PI3 cinase, Raf ou Ral-GEF. (Cortesia de R. Latek e A. Rangarajan, adaptada de dados em U. Krengel et al., *Cell* 62: 539-548, 1990.)

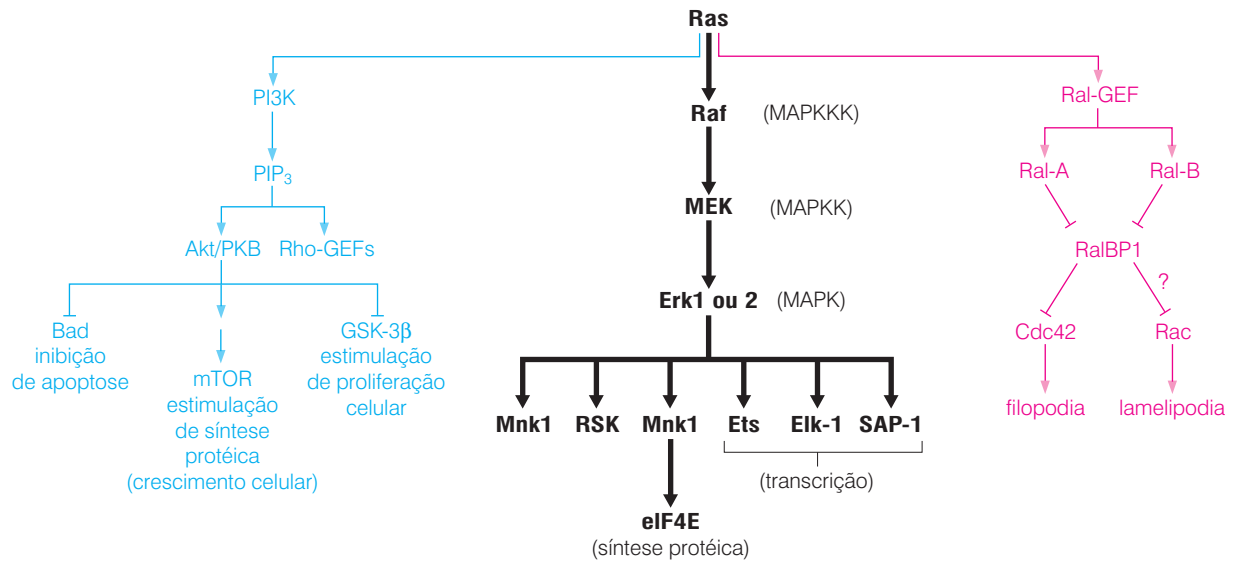


Figura 6.14 A rota de cinase Ras → Raf → MAP. Esta cascata de sinalização (*preto*) é uma de uma série de rotas similarmente organizadas em células de mamífero que têm o plano geral MAPKKK → MAPKK → MAPK. Neste caso em particular, Ras ativa a cinase Raf (uma MAPKKK), que passa a fosforilar e ativar MEK (uma MAPKK), e MEK então fosforila e ativa Erk1 e Erk2 (MAPKs). Erk2 pode então fosforilar cinases no citoplasma que regulam a tradução, assim como fatores de transcrição no núcleo.

zação em células de mamífero. Erk1 e Erk2 estão localizadas no final da cascata iniciada em Raf e são consideradas MAPKs. A cinase responsável por fosforilar uma MAPK é genericamente denominada cinase que fosforila a MAPK (MAPKK); no caso da cascata em estudo, tal papel é desempenhado por MEK. A cinase responsável por fosforilar uma MAPKK é, portanto, genericamente denominada MAPKKK (Figura 6.14); nesse esquema, Raf está classificada como uma MAPKKK.

Note que nessas várias cascatas de cinases, a fosforilação de uma cinase B por uma cinase A sempre resulta na ativação funcional da cinase B. Por exemplo, quando MEK é fosforilada por Raf, MEK torna-se ativada como uma cinase emissora de sinal. Tal fosforilação de serina/treonina tem, portanto, uma consequência muito diferente daquela da fosforilação de resíduos de tirosina realizada em caudas citoplásmicas de receptores de fator de crescimento. As fosfotirosinas nesses receptores atraem parceiras sinalizadoras e são, portanto, responsáveis pela *relocalização* de proteínas parceiras; em contraposição, os grupos fosfato ligados a MEK por Raf causam uma alteração na sua estrutura, resultando na sua *ativação funcional* como uma cinase.

A rota Ras → Raf → MEK → Erk é apenas uma entre uma série de cascatas de sinalização *downstream* que são ativadas por proteínas Ras ligadas a GTP. A importância dessa cascata de cinase na transformação celular está indicada pelo fato de que, em vários tipos celulares, a proteína cinase Raf, quando presente na forma mutante, oncogênica, pode evocar a maioria dos fenótipos transformantes que são induzidos pela oncoproteína Ras. Assim, em tais células, essa rota Raf é responsável pela maior parte dos poderes transformantes das oncoproteínas Ras.

Uma vez ativada, uma cinase Erk no final dessa cascata passa a fosforilar substratos citoplásmicos e pode também translocar-se para o núcleo, onde causa a fosforilação de fatores de transcrição; alguns dos quais então iniciam as respostas dos genes de início imediato e tardio. Por exemplo, como indicado na Figura 6.14, Erk pode fosforilar diretamente vários fatores de transcrição (Ets, Elk-1 e SAP-1) e, ainda, fosforilar – e, assim, ativar – outras cinases, que passam a fosforilar e ativar outros fatores de transcrição. Ao mesmo tempo, essas cinases *downstream* fosforilam e, portanto, reconfiguram duas proteínas associadas à cromatina (HMG-14 e histona H3); tais modificações particulares colocam a cromatina em uma configuração que é mais apropriada para a transcrição. A cinase Mnk1, um substrato citoplásmico de Erk1 e Erk2, fosforila e, portanto, ativa a iniciação da tradução do fator eIF4E, ajudando assim a ativar a maquinaria celular responsável pela síntese protéica.

Uma vez que as Erks podem fosforilar os fatores de transcrição Ets, estes últimos podem então passar a estimular a expressão de importantes genes reguladores de crescimento, tais como aqueles que especificam EGF que se liga a heparina (HB-EGF), ciclina D1, Fos e p21^{Waf1}. (As funções dos últimos três serão descritas detalhadamente no Capítulo 8.)

Especialmente importante entre os genes induzidos pela rota $\text{Raf} \rightarrow \text{MEK} \rightarrow \text{Erk}$ está a ativação dos promotores dos dois genes de início imediato que codificam os fatores de transcrição Fos e Jun. Uma vez sintetizadas, essas duas proteínas podem se associar entre si para formar AP-1, um fator de transcrição heterodimérico bastante atuante que é geralmente encontrado na forma hiperativada em células cancerígenas. A principal importância e influência de Fos e Jun está indicada pelo fato de que cada um foi originalmente identificado como um produto de um oncogene associado a retrovírus (Tabela 3.3).

Essa cascata $\text{Ras} \rightarrow \text{Raf} \rightarrow \text{MEK} \rightarrow \text{Erk}$ contribui de forma importante a certos fenótipos de células cancerígenas que são induzidos pelas oncoproteínas Ras. Além disso, para ativar uma série de genes promotores de crescimento, como descrito anteriormente, essa rota confere independência de ancoragem e perda de inibição por contato. Ela também contribui para a profunda mudança no formato celular que está associada à transformação pelo oncogene *ras*.

Em certos cânceres, a rota de sinalização *downstream* de Raf pode estar fortemente ativada sem nenhum envolvimento direto de Ras. Portanto, em 60 a 70% dos melanomas, um parente próximo e análogo funcional de Raf, chamado B-Raf, é encontrado na forma mutada, constitutivamente ativada. Permanece obscuro por que esses melanomas desenvolvem B-Raf mutante em vez de Ras mutante para dirigir sua proliferação.

6.6 Uma segunda rota *downstream* de Ras controla lipídeos inositol e a cinase Akt/PKB

Um segundo efector importante *downstream* da proteína Ras permite que a proteína Ras induza outras respostas celulares (Figura 6.15). No contexto de câncer, a mais importante destas é uma supressão do programa de apoptose celular (suicídio celular). Esse efeito antiapoptose é especialmente crítico para células cancerígenas, visto que muitas delas estão prontas para ativar este programa, uma questão abordada detalhadamente no Capítulo 9.

Estudos anteriores na bioquímica da membrana plasmática sugeriam que seus fosfolipídeos serviam apenas como uma barreira entre os meios aquosos no exterior e no interior celular. A bioquímica desses fosfolipídeos mostrou que eles são **anfipáticos** – ou seja, eles possuem uma cabeça hidrofílica, que “gosta” de estar imersa em água, e uma cauda hidrofóbica, que prefere ambientes não-aquosos (Figura 6.16A). Tal polaridade explica a estrutura de bicamadas lipídicas como a membrana plasmática, em que os grupos hidrofílicos estão voltados e se salientam para o meio aquoso extracelular e citosólico, enquanto as caudas hidrofóbicas estão enterradas no meio da membrana, de onde a água é excluída.

Na década de 1970, tornou-se aparente que células eucarióticas exploram alguns dos fosfolipídeos associados à membrana por propósitos que não estão relacionados com a manutenção da estrutura da membrana. Alguns fosfolipídeos contêm, em suas cabeças hidrofílicas, um grupo inositol. Inositol é uma molécula de carboidrato solúvel em água (mais apropriadamente denominado de poliálcool). A porção inositol de tais fosfolipídeos pode ser modificada pela adição de grupos fosfato. O fosfoinositol resultante pode então ser clivado das altamente hidrofóbicas porções remanescentes de uma molécula de fosfolipídeo. Uma vez que é puramente hidrofílico, esse fosfoinositol, chamado IP₃, pode então difundir-se da membrana (Figura 6.16B), servindo, assim, como um *hormônio intracelular* para emitir sinais da membrana plasmática para partes distantes da célula. Tais hormônios intracelulares são geralmente chamados de **mensageiros secundários**. O segundo produto dessa clivagem, denominado DAG (Figura 6.16B), pode servir para ativar uma cinase de sinalização chave na célula – a cinase serina/treonina, conhecida como proteína cinase C (PKC). Alternativamente, um fosfoinositol fosforilado pode permanecer ligado ao resto do fosfolipídeo e, portanto, pode

permanecer imerso na membrana plasmática; lá, ele pode servir como um ponto de ancoragem no qual certas proteínas citosólicas podem tornar-se ligadas.

Sabemos agora que a porção inositol pode ser modificada por várias cinases distintas, cada qual mostrando uma especificidade por fosforilar um hidroxil particular do inositol. Fosfatidilinositol 3 cinase (PI3K), por exemplo, é responsável por ligar um grupo fosfato ao hidroxil 3' da porção inositol do fosfatidilinositol imerso na membrana (PI). Várias cinases PI3 distintas foram descobertas; das quais a mais importante pode ser a PI3 que fosforila PI(4,5)P₂ (também chamada PIP₂). Antes da modificação por PI3K, PIP₂ já possuía fosfatos ligados aos grupos hidroxil 4' e 5' do inositol; após, este inositol adquire outro grupo fosfato, e PIP₂ é convertido em fosfatidilinositol (3',4',5') trifosfato (PIP₃; veja a Figura 6.16B)

Note uma importante diferença entre a organização dessa rota e a cascata Ras → Raf → MEK → Erk que abordamos na seção anterior. No presente caso, uma das cinases críticas (PI3K, por exemplo) liga fosfatos a um fosfolípídeo, em vez de fosforilar um substrato protéico, como outra cinase.

Encontramos PI3K, brevemente, em um ponto anterior neste capítulo (veja a Seção 6.3). Lá, descrevemos essa atração enzimática a certos receptores ativados por ligante via grupo SH2 de sua subunidade reguladora e a conseqüente fosforilação de fosfolípídeos contendo inositol já presentes na membrana plasmática. Ras ativada por GTP é também capaz de ligar PI3K e, portanto, aumentar sua ativação funcional (Figura 6.17). Assim, PI3K pode funcionar como um efetor direto *downstream* de Ras. Da mesma forma que Raf liga Ras, a ligação de PI3K a Ras faz com que PI3K torne-se intimamente associado à membrana plasmática, onde seus substratos PI estão localizados.

Uma vez ativado por uma ou ambas associações, PI3K desempenha um papel central em uma série de rotas sinalizadoras (p. ex., veja a Figura 5.7). Evidência disso é provida pelo fato de que essa enzima é ativada por um espectro diversificado de agentes sinalizadores, incluindo PDGF, fator de crescimento de nervo (NGF), fator de crescimento-1 semelhante a insulina (IGF-1), interleucina 3 e ligação à matriz extracelular (ECM) realizada por integrinas (veja a Seção 6.9).

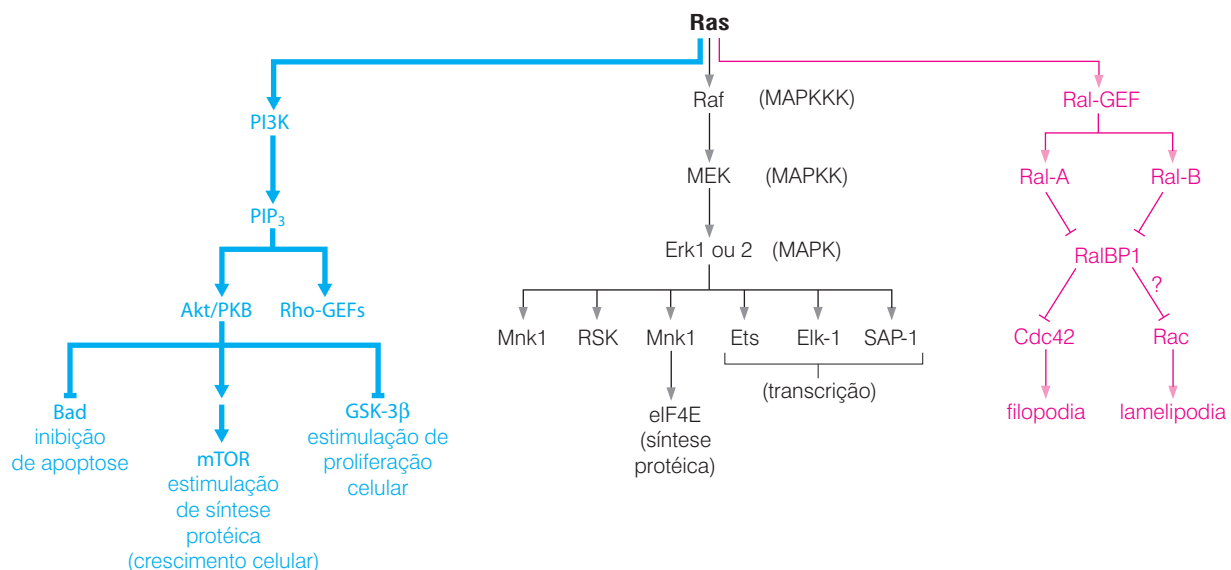


Figura 6.15 A rota de PI3 cinase Uma segunda rota efetora de Ras (azul) deriva da sua habilidade em associar-se a e ativar PI3K, formando PIP₃. Isso leva, por sua vez, a ligação de moléculas contendo PH, como Akt (também chamada PKB) e proteínas de troca de nucleotídeo de guanina Rho (Rho-GEFs), à membrana plasmática. Akt/

PKB é capaz de inativar Bad (suprimindo a apoptose), inativar GSK-3 β, um antagonista da expressão de proteínas promotoras de crescimento como ciclina D1 e Myc, e pode ativar mTOR (estimulando a síntese protéica e o crescimento celular).

A formação dos grupos de cabeças de inositol fosforilados do fosfatidilinositol tem pequeno, se algum, efeito na estrutura e na função da membrana plasmática. (Os fosfolípidos inositol são constituintes minoritários da membrana plasmática.) Entretanto, um grupo de cabeça de inositol fosforilado salientando-se da membrana plasmática pode ser reconhecido e ligado a certas proteínas que estão geralmente flutuando no citosol. Uma vez ancoradas via um fosfoinositol à membrana plasmática, tais proteínas estarão adequadamente posicionadas para liberar certos tipos de sinais, como veremos a seguir.

PIP₃ parece ser o mais importante dos grupos de cabeças de inositol fosforilados, cujo inositol carrega fosfatos nas suas posições 3', 4' e 5' (veja a Figura 6.16B). Muitas das proteínas citosólicas que são atraídas a PIP₃ têm domínios de homologia à plectrina (PH) (veja a Tabela 6.2) que têm uma forte afinidade por grupo de cabeça de inositol triplamente fosfori-

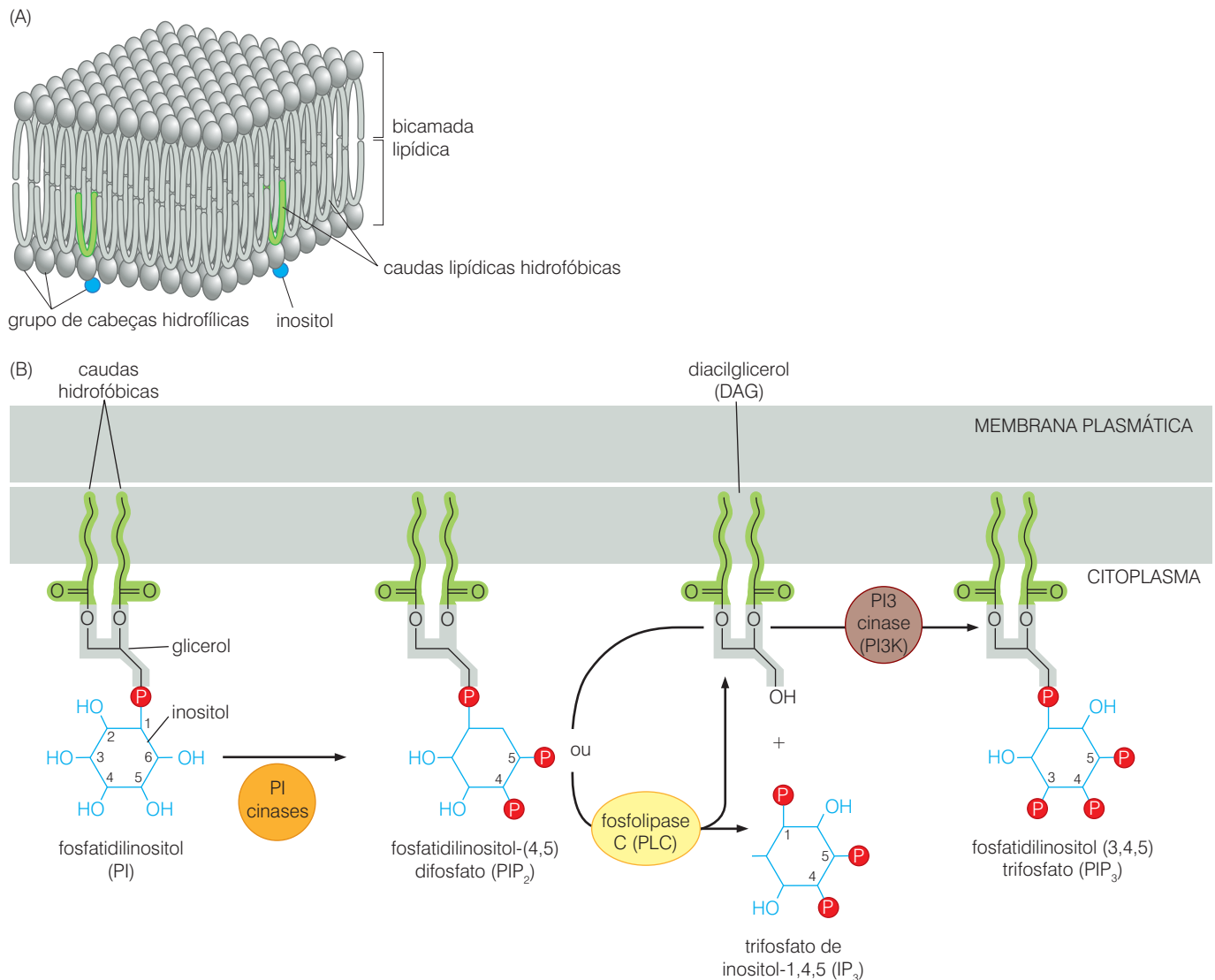


Figura 6.16 Bioquímica da bicamada lipídica (A) Todas as membranas celulares são formadas como bicamadas fosfolipídicas, nas quais os grupos de cabeças hidrofílicas (cinza, ovals) salientam-se no solvente aquoso sobre e sob a membrana, enquanto as caudas hidrofóbicas (verde, cinza) estão escondidas no espaço não-aquoso na bicamada lipídica. Uma pequena minoria dos grupos de cabeças contém açúcares inositol (azul). (B) Fosfatidilinositol (PI) (esquerda) é composto de três partes – dois ácidos graxos com longas caudas hidrocarbonadas (verde) inseridos na membrana plasmática, glicerol (cinza) e inositol (azul claro) ligado ao glicerol via uma ligação fosfodiéster. PI cinases podem adicionar

grupos fosfato aos vários hidroxilas do inositol, produzindo, por exemplo, o PI (4,5)-difosfato (PIP₂) apresentado aqui. A clivagem de PIP₂ pela fosfolipase C produz diacilglicerol (DAG), que pode ativar a proteína cinase C (PKC); e trifosfato de inositol-1,4,5 (IP₃), que induz a liberação de íons de cálcio das reservas intracelulares. De maneira alternativa, PIP₂ pode ser posteriormente fosforilado pela PI3 cinase (PI3K) para produzir fosfatidilinositol (3,4,5) trifosfato (PIP₃). Uma vez formado, o “grupo de cabeças” fosforilado de PIP₃ serve para atrair proteínas carregando domínios PH, que tornam-se, portanto, ligadas à superfície interna da membrana plasmática.

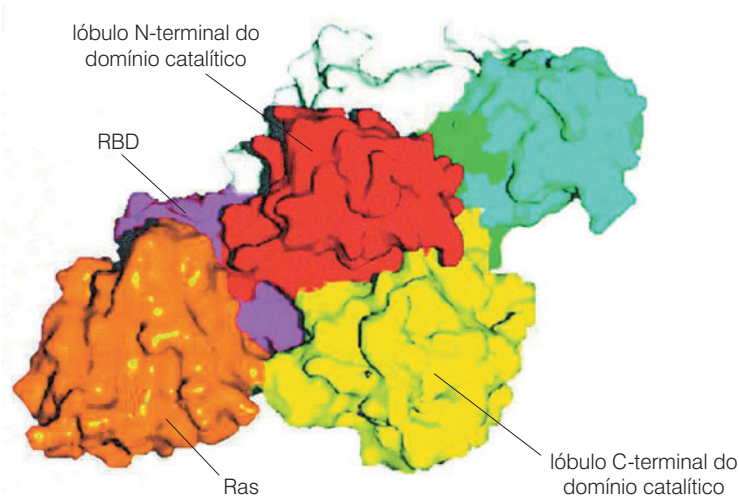


Figura 6.17 Ativação de PI3K por Ras A forte ligação de Ras (laranja) via seu domínio efetor ao domínio de ligação de Ras (RBD, lilás) da PI3 cinase permite que Ras ajude na ativação do domínio catalítico da PI3 cinase (vermelho, amarelo), que pode então passar a fosforilar o fosfolípido PIP_2 , produzindo PIP_3 . (Outras formas de PI3K supostamente têm estruturas muito similares ao PI3K γ aqui apresentado.) (De M.E. Pacold et al., *Cell* 103: 931-943, 2000.)

lado (Figura 6.18). Teoricamente, a proteína contendo domínio PH mais importante é a cinase treonina-serina chamada Akt, também conhecida como proteína cinase B (PKB). (Akt/PKB é outra proteína que foi inicialmente descoberta porque é codificada por um oncogene associado a retrovírus.) Portanto, após a formação de PIP_3 por PI3K, uma molécula de Akt/PKB cinase pode tornar-se ligada, via seu domínio PH, ao grupo de cabeça de inositol de PIP_3 que salienta-se da membrana plasmática para o citosol (Figura 6.19).

Essa associação de Akt/PKB com a membrana plasmática (junto com as fosforilações de Akt/PKB que se seguem) resulta na ativação funcional de Akt/PKB como uma cinase. Uma vez ativada por tais fosforilações, Akt/PKB passa a fosforilar uma série de substratos protéicos que tem múltiplos efeitos na célula. Os três principais efeitos biológicos de Akt/PKB nas células são (1) auxiliar na sobrevivência celular ao reduzir a possibilidade de ativação do

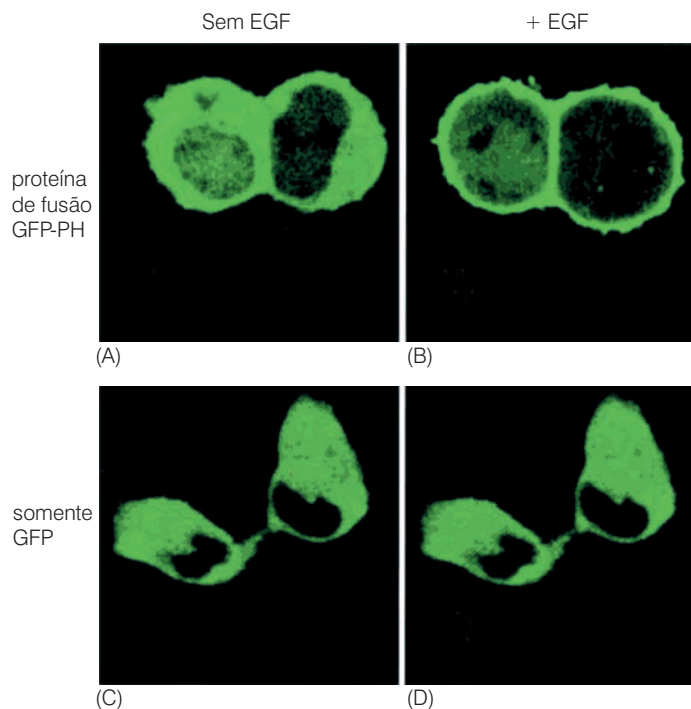


Figura 6.18 Migração de proteínas contendo PH para PIP_3 na membrana plasmática Após a formação de grupos de cabeça PIP_3 pela PI3 cinase (Figura 6.16B), eles se tornam atrativos sítios de ancoragem para proteínas contendo domínios PH. A fosforilação e endereçamento ocorrem dentro de segundos após a ativação da PI3 cinase, como revelado por esta micrografia, em que uma proteína fluorescente (proteína fluorescente verde; GFP) foi fusionada a uma proteína contendo um domínio PH. Essa proteína híbrida move-se de uma difusa distribuição pelo citoplasma (A) para a superfície interna da membrana plasmática (B) um minuto após o fator de crescimento epidermal (EGF) ter sido adicionado às células. Entretanto, se o domínio PH da proteína de fusão é inativado (C), a adição de EGF não tem efeito algum na sua distribuição intracelular (D). (De K. Venkateswarlu et al., *J. Cell Sci.* 112: 1957-1965, 1999.)

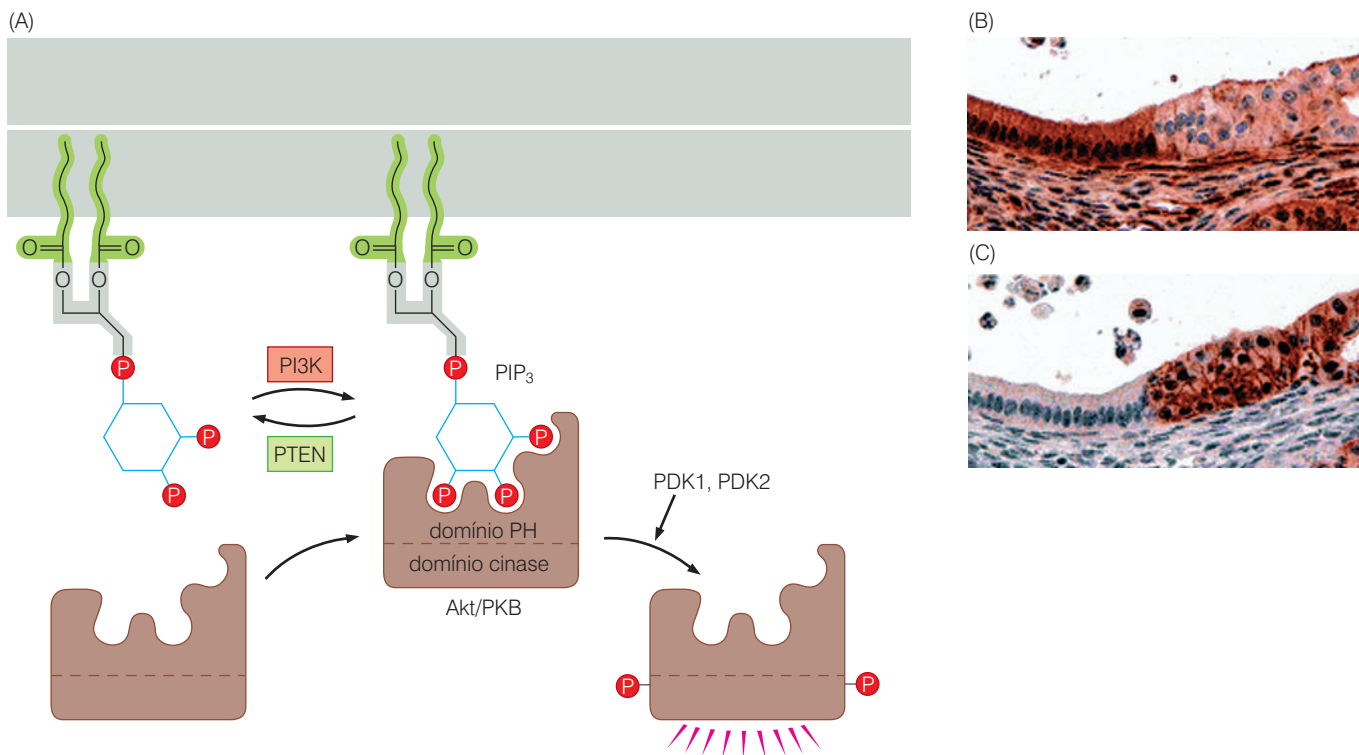


Figura 6.19 Ancoragem dos domínios PH a PIP₃. (A) A formação de PIP₃ (veja a Figura 6.16B) por PI3K cria um sítio de ancoragem para proteínas citoplásmicas que portam domínios PH (homologia à plectrina). O mais importante desses é a Akt/PKB cinase (marrom). Uma vez ancorada na superfície interna da membrana plasmática via seu domínio PH, Akt/PKB torna-se duplamente fosforilada por duas outras cinases (PDK1, PDK2) e, portanto, ativada (direita inferior). (Evidências recentes identificaram o anteriormente pouco caracterizado PDK2 como mTOR, a ser discutido no Capítulo 16.) Akt/PKB passa então a fosforilar uma variedade de substratos que regulam proliferação, sobrevivência e tamanho celular. Entretanto, se PTEN estiver também presente e ativo, ele defosforila PIP₃, convertendo-o em PIP₂, dessa forma privando Akt/PKB de um sítio de ancoragem na membrana plasmática. (B) As dinâmicas dessa interação podem ser observadas em camundongos geneticamente alterados tendo um genótipo *Pten*^{+/+}. Células epiteliais uterinas nesses camundongos geralmente perdem o alelo tipo selvagem *Pten* remanescente, produzindo células *Pten*^{-/-}, que formam hiperplasias e cistos localizados. Quando imunocoradas com anti-soro anti-PTEN, as células epiteliais na direita perderam a expressão de PTEN e tornaram-se fisicamente maiores, indicando os efeitos da rota PIP₃ no tamanho celular. (C) Quando as mesmas lesões são coradas com um anticorpo anti-fosfo-Akt/PKB (que detecta Akt/PKB ativada), as células na direita apresentam alta atividade P-Akt, enquanto aquelas na esquerda apresentam uma atividade muito baixa. (B e C, de K. Podsypanina et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 10320-10325, 2001.)

programa de suicídio apoptótico celular; (2) estimular a proliferação celular; (3) estimular o crescimento celular, no sentido mais estrito do termo, ou seja, estimulando aumentos no tamanho celular (veja a Figura 6.19B). Além disso, ele também exerce uma influência, ainda mal compreendida, na motilidade celular.

A ativação de PI3K e, portanto, de Akt/PKB, está sob um controle extremamente rígido. Em uma célula quiescente, sem crescimento, carecendo de estimulação por fator de crescimento, os níveis intracelulares de PIP₃ são extremamente baixos. Quando essas células deparam-se com mitógenos, os níveis de PIP₃ aumentam rapidamente nelas. Os níveis normalmente baixos de PIP₃ e outras moléculas PI fosforiladas são o trabalho de uma série de fosfatases que revertem as ações das cinases ativadoras como PI3K. A mais bem-caracterizada dessas fosfatases, PTEN, remove o grupo fosfato 3' de PIP₃ que estava previamente ligado por PI3K (veja a Figura 6.19). Essa remoção sugere dois distintos mecanismos pelos quais a rota de sinalização Akt/PKB pode se tornar desregulada em células cancerígenas – hiperatividade de PI3K ou inatividade de PTEN.

O *portfólio* da diversidade de funções biológicas designado por Akt/PKB requer que essa cinase seja capaz de fosforilar uma variedade de substratos, cada um envolvido em uma rota distinta de sinalização *downstream* (Tabela 6.3). A primeira dessas funções – facilitando a sobrevivência celular – depende da habilidade de Akt/PKB em suprimir qualquer tendência que a célula tenha de ativar seu próprio programa intrínscio de suicídio apoptótico. Deferiremos uma discussão detalhada sobre apoptose até o Capítulo 9. Por enquanto, é suficiente dizer que a fosforilação por Akt/PKB resulta na inibição de uma série de proteínas que desempenham papéis proeminentes, favorecendo a entrada de uma célula em apoptose.

As funções proliferativas de Akt/PKB dependem da sua habilidade em perturbar proteínas que são importantes para regular o avanço de uma célula a partir do seu ciclo de crescimento e divisão, geralmente chamado de ciclo celular. Aprenderemos mais sobre esse complexo programa no Capítulo 8.

Independentemente desses efeitos na proliferação, Akt/PKB é capaz de induzir modificações drásticas nas proteínas que controlam a taxa de síntese proteica na célula. Akt/PKB fosforila e inativa uma proteína denominada TSC2, que age a partir de intermediários para desencadear a inativação da mTOR cinase; esta então fosforila e inativa 4E-BP, um potente inibidor da tradução e, ao mesmo tempo, fosforila e, portanto, ativa a p70S6 cinase, um ativador da tradução. Tais alterações permitem que Akt/PKB aumente a eficiência com a qual a tradução de uma classe de mRNAs é iniciada; a elevada taxa de síntese proteica resultante favorece o acúmulo de muitas proteínas celulares e é manifestada no crescimento das células (em vez de na proliferação). (Retornaremos à organização detalhada dessa rota na Seção 16.15). Uma ilustração dos poderes de indução de crescimento de Akt/PKB é provida por camundongos transgênicos que expressam um Akt/PKB mutante, constitutivamente ativa, em células β do pâncreas (Figura 6.20); nesses camundongos, tais células crescem até um tamanho maior que duas vezes a área de corte transversal de uma célula β normal (e quase quatro vezes o volume)!

Há evidências de que outras proteínas citoplasmáticas utilizam seus domínios PH para se associar a PIP_3 , e que tal associação também favorece sua ativação funcional. Entre as proteínas celulares carregando PH está um grupo de fatores de troca de nucleotídeos de guanina (GEFs) que funcionam de forma análoga a Sos, sendo responsáveis por ativar uma série de pequenas GTPases que são parentes distantes das proteínas Ras. Essas outras GTPases pertencem à família Rho de proteínas sinalizadoras, que inclui a própria Rho e seus dois primos, Rac e Cdc42. Da mesma forma que Ras, essas proteínas Rho operam como interruptores binários, alternando entre um estado de sinalização ativo ligado a GTP e um estado inativo ligado a GDP (veja a Barra lateral 6.4). As Rho-GEFs, uma vez ativadas pela ligação a PIP_3 , agem em proteínas Rho da mesma forma que Sos age em Ras. Em particular, as Rho-GEFs induzem proteínas Rho a descartar seus GDPs ligados, permitindo que GTP se ligue e ative as Rhos.

Uma vez ativadas dessa forma, essas proteínas semelhantes a Rho (Rac e Cdc42) têm funções que diferem consideravelmente daquelas de Ras: elas participam da reconfiguração da estrutura do citoesqueleto e das ligações que a célula faz com seus arredores fisi-

Tabela 6.3 Efeitos de Akt/PKB na sobrevivência, proliferação e crescimento celular

Efeito biológico	Substrato de Akt/PKB	Consequência funcional
Antiapoptótico	Bad (pró-apoptótico) ^a	inibição
	caspase-9 (pró-apoptótico) ^b	inibição
	I κ B cinase (antiapoptótico) ^c	ativação
	TF FOXO1 (pró-apoptótico) ^d	inibição
	Mdm2 (antiapoptótico) ^e	ativação
Proliferativo	GSK-3 β (antiproliferativo) ^f	inibição
	FOXO4 (antiproliferativo) ^g	inibição
	p21 ^{Cip1} (antiproliferativo) ^h	inibição
Crescimento	Tsc2 (anticrescimento) ⁱ	inibição

^aBad é um antagonista de Bcl-X; ambos são membros da família Bcl-2 de proteínas que controlam poros na membrana mitocondrial (Seção 9.13).

^bCaspase-9 é um componente da cascata de protease que atua no programa apoptótico (Seção 9.13).

^cI κ B cinase, geralmente indicada como IKK, é fosforilada e ativada por Akt/PKB (Seção 6.12).

^dFosforilação do TF *forkhead* (FOXO1, previamente denominado FKHR) previne sua translocação nuclear e subsequente ativação de genes pró-apoptóticos.

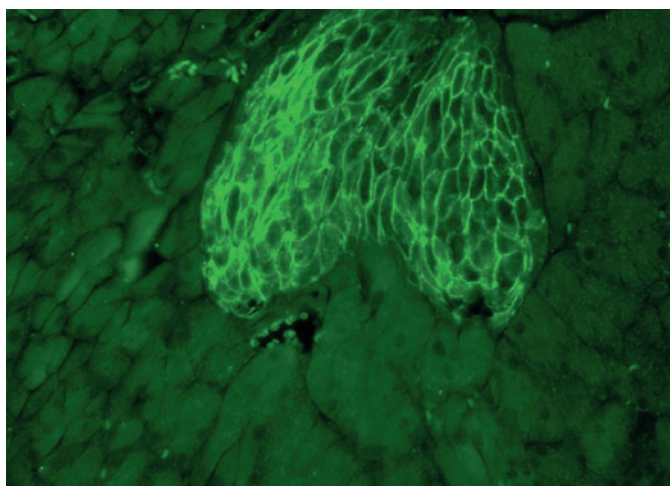
^eMdm2, uma vez fosforilado por Akt/PKB, é ativado e passa a desencadear a destruição de p53 (Seção 9.7).

^fAkt/PKB fosforila e inativa a glicogênio sintase cinase-3 β (GSK-3 β), que é normalmente responsável por fosforilar ciclina D1 (Seção 8.5), causando sua degradação.

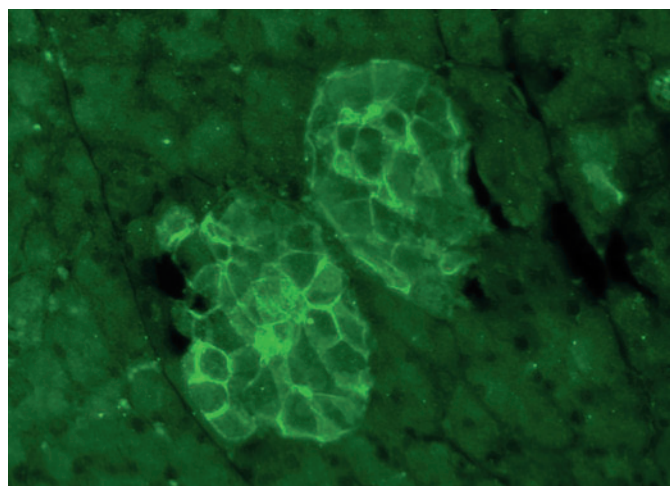
^gFOXO4 (formalmente conhecida como AFX) induz a expressão do gene do inibidor de CDK p27^{Kip1} (Seção 8.4) e de alguns genes pró-apoptóticos; uma vez fosforilado por Akt/PKB, FOXO4 é exportado do núcleo.

^hp21^{Cip1} é um inibidor de CDK como p27^{Kip1} (Seção 8.4). A fosforilação por Akt/PKB causa sua saída do núcleo. Uma vez no citoplasma, o p27^{Kip1} fosforilado resultante foi reportado por atuar como um inibidor de caspase, dessa forma adquirindo funções antiapoptóticas (Seção 9.13).

ⁱA fosforilação de Tsc2 por Akt/PKB causa a dissociação do complexo Tsc1/Tsc2, permitindo a ativação de mTOR, que passa a ativar a síntese proteica (Seção 16.15).



(A)



(B)

Figura 6.20 Akt/PKB e o controle do crescimento celular As células endócrinas β nas ilhas pancreáticas são normalmente responsáveis por secretar insulina em resposta a elevadas concentrações de glicose no sangue. (A) Uma micrografia de uma ilha pancreática normal. (B) Se uma cinase Akt/PKB constitutivamente ativa é seletivamente expressa em ilhotas celulares, elas crescem até volumes quatro vezes maiores do que o normal. (De R.L. Tuttle et al., *Nat. Med.* 7: 1133-1137, 2001.)

cos. Sendo assim, elas controlam o formato e a motilidade celular e, no caso de células cancerígenas, a invasividade. Por exemplo, Cdc42 está envolvida na reorganização do citoesqueleto de actina da célula, assim como no controle dos **filopódios**, pequenas extensões semelhante a dedos a partir da membrana plasmática que a célula utiliza para explorar seu ambiente; enquanto Rac está envolvida na formação de **lamelipódios**, ondas amplas que se estendem da membrana plasmática, que são encontrados nas bordas frontais de células móveis. Visto que tais processos estão intimamente ligados aos passos de invasão celular tumoral e metástase, discutiremos mais sobre essas proteínas semelhantes a Rho e seus mecanismos de ação até o Capítulo 14.

A rota envolvendo metabólitos PI e Akt/PKB é desregulada em uma série de tipos celulares de câncer humano a partir de modificações que em geral são bastante independentes da ação da oncoproteína Ras (Tabela 6.4). Em alguns carcinomas de ovário, uma forma de PI3K é superexpressa e, presumivelmente, bastante ativa. Em outros tumores, como linfomas, cânceres de cabeça e pescoço e carcinomas de cólon, a enzima Akt/PKB é superexpressa e, presumivelmente, hiperativada.

Barra lateral 6.4 Ras é o protótipo de uma grande família de proteínas similares

Ras é apenas uma de uma grande família de 35 proteínas similarmente estruturadas, que, juntas, são chamadas de “pequenas proteínas G”, para distingui-las da outra classe de proteínas maiores, as quais ligam nucleotídeo guaninas heterotriméricas e são ativadas pela associação com receptores de superfície celular que transpassam sete vezes a membrana (serpentina) (veja a Figura 5.25). A maior parte dessas pequenas proteínas G tem recebido nomes de três letras, cada uma derivada, de alguma forma, das proteínas Ras inicialmente nomeadas e descobertas – por exemplo, Ral, Rac, Ran, Rho, etc. (A proteína Cdc42 é um membro da família Rho que manteve seu próprio nome devido ao seu descobrimento inicial a partir da genética de levedura.)

Muito dessa similaridade seqüencial compartilhada entre essas diversas proteínas é encontrado nas cavidades que ligam e hidrolisam nucleotídeos guanina. Cada uma dessas pequenas proteínas G

opera da mesma forma que Ras, como um interruptor binário, utilizando um ciclo GTP-GDP-GTP para alternar entre um estado ligado e desligado. Assim como Ras, cada uma dessas proteínas tem seus próprios fatores de troca de nucleotídeos de guanina (GEFs) para ativá-las (por promover a reposição de GDP por GTP) e suas próprias proteínas ativadoras de GTPases (GAPs) para desencadear sua atividade GTPase.

Cada uma dessas pequenas proteínas G foi adaptada para controlar um processo fisiológico e bioquímico celular distinto, incluindo regulação da estrutura do citoesqueleto e apoptose. Uma é até mesmo utilizada para regular o transporte de proteínas através de poros na membrana nuclear. A única característica compartilhada comumente por esses diversos processos biológicos celulares é a necessidade de ser regulado por algum tipo de mecanismo de troca binário – uma operação para a qual pequenas proteínas G são idealmente adequadas.

Tabela 6.4 Alteração da rota PI3K em tumores humanos

Tipo de câncer	Tipo de alteração
Glioblastoma (25-50%)	Mutação <i>PTEN</i>
Carcinoma de ovário	Mutação <i>PTEN</i> ; amplificação <i>AKT2</i> ; amplificação <i>PI3K</i> ; mutação <i>PI3K p85α</i>
Carcinoma de mama	Atividade Akt1 aumentada; amplificação <i>AKT2</i> ; mutação <i>PTEN</i>
Carcinoma endometrial (35%)	Mutação <i>PTEN</i> ; metilação <i>PTEN</i> ^a
Carcinoma hepatocelular	Mutação <i>PTEN</i>
Melanoma	Mutação <i>PTEN</i> ; metilação <i>PTEN</i> ^a
Carcinoma pulmonar	Mutação <i>PTEN</i>
Carcinoma de célula renal	Mutação <i>PTEN</i>
Carcinoma de tireóide	Mutação <i>PTEN</i> ; superexpressão de Akt/PKB
Linfóide	Mutação <i>PTEN</i>
Carcinoma de próstata (40-50%)	Mutação <i>PTEN</i>
Carcinoma de cólon (> 30%)	Superexpressão de Akt/PKB; mutação <i>PI3K</i>

^aMetilação refere-se a repressão da transcrição de um gene a partir da metilação de citidinas em seu promotor; veja a Seção 7.8.

Adaptada de I. Vivanco e C.L. Sawyers, *Nat. Rev. Cancer* 2: 489-501, 2002.

PI3K é hiperativada em quase um terço dos carcinomas de cólon humano devido a mutações que afetam sua subunidade regulatória, chamada p110α. Entretanto, a perda da função de *PTEN* é consideravelmente mais responsável pela atividade desregulada de Akt/PKB, sendo observada em muitos tipos de células cancerígenas humanas (veja a Tabela 6.4). Em uma série de distintos tipos tumorais, incluindo carcinomas de mama e próstata, assim como glioblastomas, a atividade de *PTEN* é perdida devido a mutações no gene cromossomal ou eventos de metilação do DNA que suprimem a expressão do gene *PTEN*. A atividade de *PTEN* é perdida em 30 a 40% de todos os cânceres humanos. O resultante acúmulo de altos níveis de PIP₃ fosforilado resulta nas consequências *downstream* anteriormente enumeradas. Esse comportamento de *PTEN* de suprimir a proliferação celular indica que ele funciona como um gene supressor de tumor, um tópico que exploraremos no Capítulo 7.

6.7 Uma terceira rota regulada por Ras age a partir de Ral, uma prima distante de Ras

A terceira das três principais rotas efetoras *downstream* de Ras envolve um par de proteínas semelhantes a Ras chamadas Ral-A e Ral-B, que compartilham 58% de identidade de sequência com Ras (veja a Barra lateral 6.4). Da mesma forma que para Ras, a ativação funcional dessas proteínas Ral envolve a troca de GDP ligado por GTP.

A comunicação entre Ras e Ral é mediada por fatores de troca de nucleotídeos de guanina Ral (GEFs), os quais podem estimular uma proteína Ral a liberar seu GDP e ligar GTP, refletindo, assim, os efeitos de Sos em Ras. Além do seu domínio GEF, cada Ral-GEF tem um bolso que pode ligar Ras ativada. Essa associação com Ras tem duas consequências para Ral-GEF: Ras causa o posicionamento dos Ral-GEFs perto da superfície interna da membrana plasmática. Além disso, a ligação de Ras parece causar uma modificação conformacional em Ral-GEFs que ativa suas atividades de fator de troca de nucleotídeo de guanina intrínseca.

A resultante ativação das proteínas Ral-A e Ral-B lhes permite regular alvos *downstream* no circuito de sinalização (Figura 6.21). Por exemplo, a rota Ral pode inativar duas das proteínas Rho citadas na última seção – Cdc42 e Rac. Rac pode também emitir sinais mitogênicos e, por estimular a produção de espécies reativas de oxigênio, antagoniza as ações de uma série de proteínas Rho. Apesar de ainda serem pouco compreendidas, as proteínas Ral provavelmente desempenham papéis-chave na motilidade que possibilita às células cancerígenas invadir e fazer metástases.

A descrição funcional de Ras como uma oncoproteína de ação pleiotrópica pode agora ser explicada em nível bioquímico pelas ações de três cascatas de sinalização *downstream* que irradiam de Ras. Seria favorável se cada um dos fenótipos que associamos à ação da oncoproteína Ras (p. ex., independência de ancoragem, sobrevivência, proliferação, taxa biossintética, etc.) pudesse ser especificamente associado às ações de um de três efetores de Ras. Na verdade, as coisas são um pouco mais complicadas: a maioria dos fenótipos induzidos por Ras parece ser resultante da ação colaborativa de uma série desses fatores.

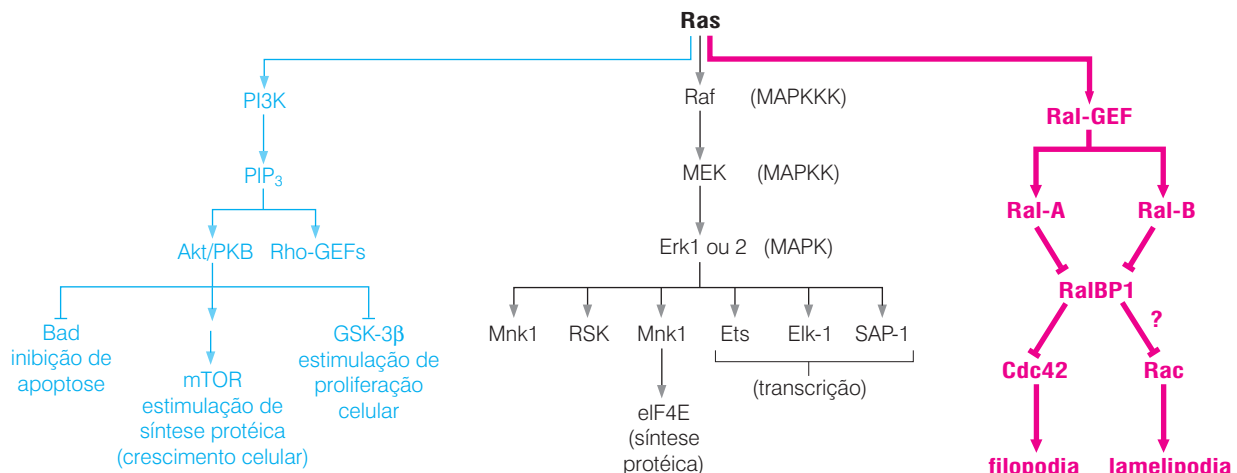
Existem ainda duas outras dimensões de complexidade. Primeiramente, tratamos de Ras como sendo uma única proteína, mas existem indicações de que as quatro proteínas Ras (uma espécie H-Ras, uma N-Ras e duas K-Ras) agem de formas diferentes em localizações citoplasmáticas distintas. Além disso, nossa lista de três efetores de Ras (Raf, PI3K e Ral-GEF) é dificilmente completa. Está claro que Ras pode interagir com uma série de outros efetores ainda pouco caracterizados que lhe permitem induzir outras modificações na célula.

Em qualquer organização hierárquica, aqueles indivíduos próximos ao topo exercem um poder e influência muito maiores do que os que estão mais abaixo. Ao ativar múltiplas rotas de controle concomitantemente, uma oncoproteína Ras (ou um sinal estimulatório emitido por um de seus controladores *upstream*) induz muitas das modificações fenotípicas adquiridas por uma célula durante o curso da transformação neoplásica. Em contraposição, a desregulação de uma ou outra das rotas *downstream* de Ras confere apenas uma fração dessas modificações fenotípicas e, portanto, produz muito menos vantagens de crescimento para o que seria uma célula cancerígena. Esse fato está bem ilustrado pelos alelos mutantes do gene que codifica a B-Raf cinase, o primo próximo de Raf, anteriormente citado, que também é ativado pela interação com Ras. As referidas mutações, que são encontradas em muitos melanomas humanos, criam alelos *BRAF* oncogênicos que têm poderes transformantes 50 vezes menores que os da oncoproteína Ras ativada com a substituição de glicina por valina. Presumivelmente, componentes sinalizadores localizados *downstream*, quando alterados por mutação, conferem menos benefícios ainda (ou seja, vantagem seletiva) em células pré-neoplásticas em desenvolvimento e, portanto, são raramente encontrados nos genomas de células tumorais humanas.

Figura 6.21 Ral e o controle do citoesqueleto
A interação de Ras com Ral-GEF (vermelho) permite que este último ative as proteínas Ral-A e Ral-B. As proteínas Ral ligadas a GTP resultantes passam a ativar uma série de rotas *downstream*; proeminente entre elas estão aquelas que ativam Cdc42 e Rac, que, por sua vez, possibilitam a motilidade celular a partir de seus efeitos no citoesqueleto de actina.

6.8 A rota Jak-STAT permite que sinais sejam transmitidos da membrana plasmática diretamente para o núcleo

Como foi mencionado na Seção 5.7, o estudo de uma série de receptores para **citocinas** – fatores de crescimento que estimulam componentes do sistema hematopoiético – tem



revelado moléculas receptoras que são construídas de forma um pouco diferente da maioria dos receptores de fator de crescimento que foram discutidos no capítulo anterior. Essas proteínas receptoras em particular não portam domínios tirosina cinase covalentemente associados; em vez disso, formam complexos não-covalentes com tirosinas cinases da classe Janus cinase (Jak) (Figura 6.22). Incluído entre tais complexos estão os receptores para interferon (INF), eritropoietina (EPO) e trombopoietina (TPO). Interferon é um importante mediador da função de células imunes, como aprenderemos no Capítulo 15; as outras duas controlam **eritropoiese** (formação de células vermelhas) e **trombopoiese** (formação de plaquetas), respectivamente.

Seguindo a dimerização mediada pela ligação do receptor, a enzima Jak associada a cada molécula receptora fosforila tirosinas nas caudas citoplasmáticas de moléculas receptoras parceiras, de forma muito semelhante à transfosforilação que ocorre após a ativação por ligação de receptores como EGF-R e PDGF-R. As fosfotirosinas resultantes atraem e são ligadas por fatores de transcrição contendo SH2 chamados transdutores de sinal e ativadores de transcrição (STATs). Uma vez associados aos receptores, esses STATs tornam-se fosforilados pelas Jaks. Isso cria moléculas STAT individuais que possuem tanto grupos SH2 como fosfotirosinas. É importante salientar que os grupos SH2 apresentados pelos STATs têm uma especificidade por ligar-se a resíduos de fosfotirosina que foram recém-sintetizados nos STATs. Conseqüentemente, formam-se dímeros STAT-STAT, em que cada STAT utiliza seu grupo SH2 para ligar-se às fosfotirosinas de seu parceiro. Os STATs dimerizados resultantes migram para o núcleo, onde agem como fatores de transcrição (veja a Figura 6.22).

Os STATs ativam genes-alvo que são importantes para a proliferação e sobrevivência celular. Incluído entre os genes de proliferação e sobrevivência estão os *myc*, genes que especificam ciclinas D2 e D3 (que permitem que células avancem por seus ciclos de crescimento e divisão), e os genes que codificam a proteína fortemente antiapoptótica Bcl-X_L. Além de fosforilar STATs, as Jaks podem fosforilar substratos que ativam outras rotas mitogênicas, incluindo a rota Ras-MAPK descrita anteriormente.

Evidências conectando STATs com patogênese de câncer estão rapidamente sendo acumuladas. Talvez a indicação mais dramática da contribuição de STATs para o desenvol-

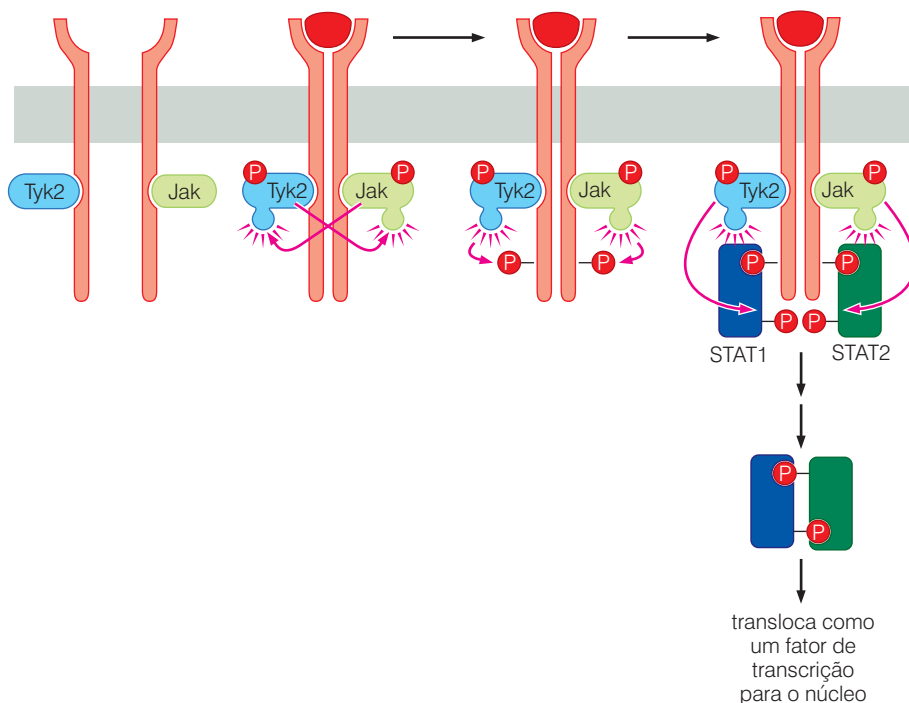


Figura 6.22 A rota Jak-STAT A rota Jak-STAT depende das ações de Jak tirosina cinases (Jak1, Tyk2, por exemplo), que estão não-covalentemente ligadas a uma série de receptores de tirosina, incluindo aqueles para INFs, EPO e TPO. Quando um ligante ativa um receptor via dimerização, os Jaks (neste caso, Jak1 e Tyk2) transfosforilam um ao outro, assim como as caudas C-terminais dos receptores. As fosfotirosinas resultantes atraem proteínas STAT, como STAT1 e STAT2, aqui apresentadas, que se ligam via seus domínios SH2 e tornam-se fosforiladas pelas Jaks. Em seguida, os STATs dimerizam-se, cada um utilizando seu domínio SH2 para ligar-se à fosfotirosina de seu parceiro, e então translocar-se para o núcleo, onde operam como fatores de transcrição para ativar a expressão de genes-chave, como o gene que codifica um interferon.

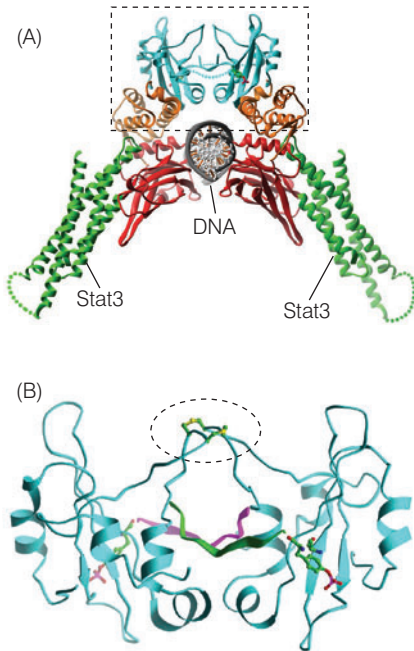


Figura 6.23 Ativação constitutiva de Stat3 (A) As proteínas Stat3 normalmente dimerizam a partir de suas regiões C-terminais para formar fatores de transcrição diméricos que circundam o DNA dupla-fita (*estrutura circular cinza, no meio*). (B) O uso de mutagênese sítio dirigida permitiu a inserção de dois resíduos de cisteína no domínio C-terminal que levaram à dimerização covalente de tal domínio. A estrutura detalhada da região C-terminal observada em azul esverdeado no painel A (*caixa de linha tracejada*) está apresentada em mais detalhe aqui. A ligação de dissulfeto que liga os dois monômeros está apresentada em amarelo e verde no meio da parte superior desta imagem (*círculo tracejado*). (De J. Bromberg et al., *Cell* 98: 295-303, 1999.)

vimento de câncer tenha vindo da reengenharia da proteína Stat3 a partir da introdução de um par de resíduos de cisteína, que causa a dimerização espontânea do mutante Stat3 resultante, formando estáveis ligações covalentes dissulfeto. Esses dímeros Stat3 estabilizados são cópias estruturais e funcionais dos dímeros que em geral são formados quando Stat3 é fosforilada por Jaks. Essa proteína mutante Stat3 é agora constitutivamente ativa como um fator de transcrição nuclear e pode funcionar como uma oncoproteína que é capaz de transformar NIH 3T3 e outras células imortalizadas de camundongo a um estado tumorigênico (Figura 6.23).

Stat3 é também conhecida por ser constitutivamente ativada em uma série de cânceres humanos. Por exemplo, em muitos melanomas, sua ativação é aparentemente atribuída a Src, que também é constitutivamente ativa nessas células cancerígenas; de fato, pelo menos quatro outros primos de Src, todos não-receptores de tirosina cinase, também podem fosforilar e, portanto, ativar Stat3. Isso destaca o fato de que STATs podem ser ativados no citoplasma por tirosinas cinases diferentes das Jaks associadas a receptores. No caso de células de melanomas, a inibição de Src, que leva à desativação de Stat3, desencadeia apoptose, apontando para a importante contribuição de Stat3 em garantir a sobrevivência dessas células cancerígenas.

Na maioria das células de câncer de mama, Stat3 é constitutivamente ativada; em algumas delas, Stat3 é fosforilada por Src e Jaks agindo em colaboração. Como no caso de células de melanoma, a reversão da ativação de Stat3 nas células de câncer de mama leva a inibição de crescimento e apoptose. Em quase todos os cânceres de cabeça e pescoço, Stat3 é também constitutivamente ativada, possivelmente a partir das ações do receptor de EGF. Assim, essas várias evidências convergem para a noção de que STATs representam importantes mediadores de transformação em uma variedade de tipos celulares de câncer humano.

6.9 Receptores de adesão celular emitem sinais que convergem com aqueles liberados por receptores de fator de crescimento

No último capítulo, lemos que células monitoram continuamente suas ligações a componentes da matriz extracelular (ECM). A bem-sucedida ligação a moléculas que formam ECM, alcançada via integrinas, causa a liberação de sinais de sobrevivência para o citoplasma que diminuem a probabilidade de uma célula entrar em apoptose. Ao mesmo tempo, a ativação de integrinas, provocada por sinais gerados dentro da célula, pode promover motilidade celular por estimular moléculas de integrina localizadas em sítios específicos à membrana plasmática para forjar novas ligações com a ECM. Como consequência, integrinas apresentam as três funções de (1) ligar fisicamente as células a ECM, (2) informar as células se a ligação a certos componentes da ECM foi ou não realizada e (3) facilitar a motilidade ao fazer e desfazer contatos com a ECM.

Como foi descrito no capítulo anterior, integrinas podem se concentrar e formar ligações múltiplas com ECM em áreas pequenas e localizadas chamadas *adesões focais* (veja a Figura 5.28A). Tal agrupamento provoca a ativação da cinase de adesão focal (FAK), uma tirosina cinase não-receptora, como Src, que está associada às caudas citoplasmáticas das subunidades β de certas moléculas de integrina e torna-se fosforilada, presumivelmente por transfosforilação, após a congregação de integrinas nessas adesões focais. Um dos resíduos de fosfotirosina resultantes em FAK provê um sítio de ancoragem para moléculas de Src (Figura 6.24A). Src então passa a fosforilar tirosinas adicionais em FAK, e as fosfotirosinas resultantes servem como sítios de ancoragem para outras moléculas sinalizadoras contendo SH2, incluindo Grb2, Shc, PI3K e PLC- γ . Há também evidências de que Grb2, uma vez ligado à FAK tirosina fosforilada, pode recrutar Sos para esse complexo. Este complexo passa a ativar seus alvos normais *downstream*, incluindo Ras e PI3K. De fato, a complexidade total da sinalização *downstream* de integrinas ainda aguarda resolução (Figura 6.24B).

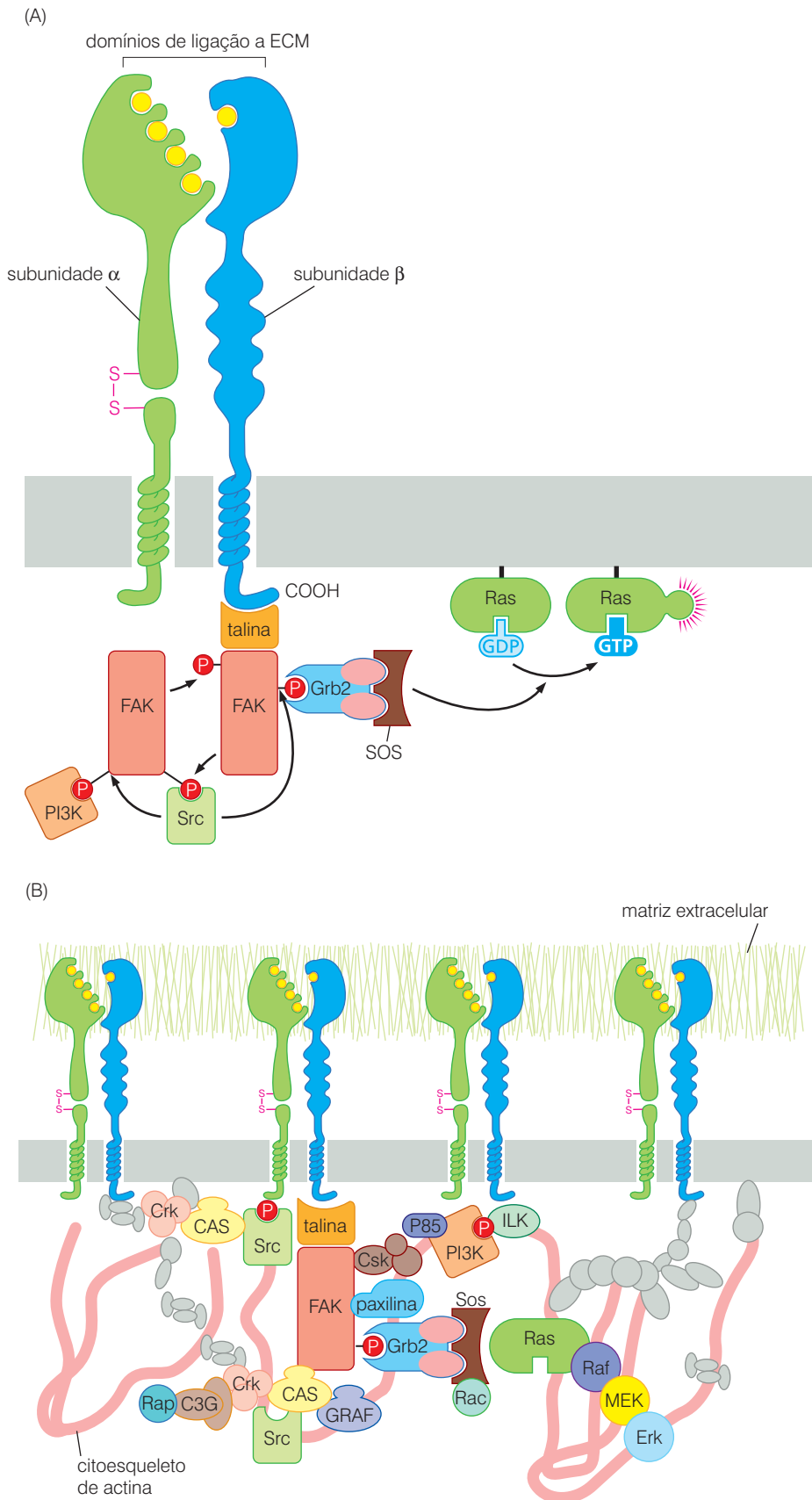
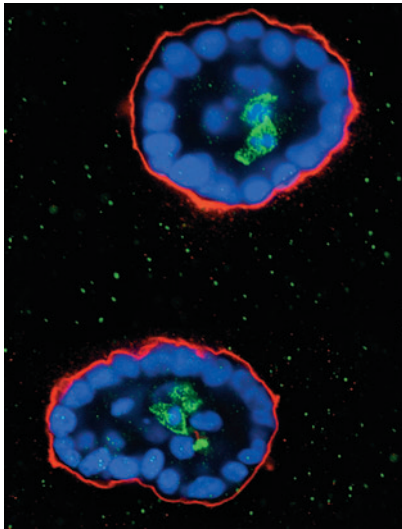
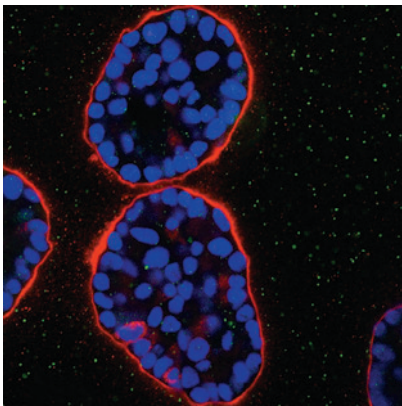


Figura 6.24 Sinalização de integrinas (A) As integrinas são formadas como heterodímeros $\alpha + \beta$. Além de ligar fisicamente o citoesqueleto à matriz extracelular (veja a Figura 5.28B), a ligação pelo ectodomínio do heterodímero a componentes da ECM desencadeia a associação de uma série de proteínas transdutoras de sinal citoplásmicas, como FAK (*rosa*), ao domínio citoplásmico da subunidade β . As transfosforilações resultantes e a atração de moléculas sinalizadoras contendo SH2 liberam sinais que ativam muitas das mesmas rotas que são ativadas por receptores de fator de crescimento ativados por ligante. (B) Como está indicado aqui, as moléculas apresentadas no painel A representam apenas parte de uma complexa coleção de moléculas transdutoras de sinal ainda mal compreendida que torna-se fisicamente associada aos domínios citoplásmicos de várias subunidades β de integrina após a ligação de ECM. (Adaptada de C. Miranti e Brugge, *Nat. Cell Biol.* 4: E83-E90, 2002.)



(A)



(B)

Figura 6.25 *Anoikis* e morfogênese. *Anoikis* serve, durante a morfogênese, para escavar lúmens (canais) no centro de agregados cilíndricos celulares, criando, assim, ductos ocos. Quando colocadas em cultura suspensa, células epiteliais mamárias (MECs) humanas formam agrupamentos globulares – ácinos –, os quais imitam, mesmo que superficialmente, as estruturas de ductos de glândulas mamárias. (A) Um ácino é visto aqui em corte transversal circundado por uma camada de membrana basal (uma forma de matriz extracelular) contendo laminina-5 (vermelho) que as células sintetizaram. As células que conseguem se ligar a essa membrana basal via suas integrinas são saudáveis e têm núcleo grande (azul), enquanto aquelas que são desprovidas da ligação direta a essa membrana basal são submetidas a *anoikis*, resultando na formação de uma proteína (caspase-3 ativada; verde) que é indicativo de apoptose ativa; essas células centrais também exibem núcleos fragmentados (azul), outro sinal de apoptose. A perda dessas células produzirá um lúmen nesse ácino. (B) Em um passo primário do desenvolvimento de câncer mamário, *anoikis* normal e a escavação resultante do lúmen de um ducto mamário podem ser prevenidos pelas ações de certas proteínas antiapoptóticas. Neste caso, a expressão da proteína Bcl-X_L antiapoptótica em MECs resultou na supressão de apoptose e, portanto, no preenchimento do lúmen, ecoando o aparecimento de certas hiperplasias ductais e carcinomas *in situ* geralmente observados nos primeiros passos do desenvolvimento de câncer mamário. (Cortesia de J. Debnath e J. Brugge.)

As evidências acumuladas sugerem uma rota que possui, ao menos, os seguintes componentes:

ECM → integrinas → Sos → Ras → Erk

Os paralelos entre sinalização por integrinas e tirosinas cinases são evidentes: receptores de tirosina cinase ligam ligantes de fatores de crescimento no espaço extracelular, enquanto integrinas ligam componentes da matriz extracelular como ligantes. Uma vez ativadas, essas duas classes de sensores ativam muitas das mesmas cascatas transdutoras de sinal *downstream*. Além disso, algumas integrinas co-localizam-se com certos receptores de tirosina cinase; essa associação parece ser necessária para a ativação dos dois tipos de receptores.

Essa convergência de rotas sinalizadoras parece explicar um dos importantes efeitos biológico-celulares da oncoproteína Ras – sua habilidade em capacitar células a crescer de forma independente de ancoragem. Parece que células normalmente dependem da sinalização de integrinas para prover uma medida de ativação da proteína Ras normal. Na ausência dessa sinalização, as células passam a “acreditar” que falharam em associar-se com a matriz extracelular. Isso pode bloquear o avanço das células a partir de seus ciclos de crescimento e divisão ou, mais drasticamente, pode desencadear a entrada de células para a forma de morte celular programada denominada *anoikis*, que é desencadeada quando as células perdem sua ligação a substratos sólidos. O ato de evitar tal *anoikis* parece representar um dos primeiros passos na iniciação de cânceres de mama (Figura 6.25).

Essas diversas observações sugerem que Ras oncogênica promove proliferação independente de ancoragem ao imitar um dos sinais críticos *downstream* resultante da ligação da matriz extracelular por integrinas. Assim, Ras oncogênica pode enganar uma célula, fazendo-a “acreditar” que suas integrinas conseguiram ligar componentes de ECM, permitindo assim que uma célula transformada por *ras* prolifere, mesmo quando não tenha ocorrido tal ligação.

6.10 A rota Wnt-β-catenina contribui para a proliferação celular

Na maioria dos tipos celulares, a cascata RTK → Sos → Ras parece desempenhar um papel dominante em mediar respostas a mitógenos extracelulares, mas raramente é a única rota que

tem tal resultado. Outras rotas não compreendidas completamente também conferem responsividade a sinais mitogênicos presentes na superfície celular. Proeminente entre estas está a rota controlada por fatores Wnt, de onde mais de uma dúzia pode ser encontrada em vários tecidos humanos. Além de transduzir sinais mitogênicos, essa rota permite que células permaneçam em um estado relativamente indiferenciado – um importante atributo de certos tipos de células cancerígenas.

Como aprendemos no capítulo anterior (veja a Seção 5.7), o desenho molecular da rota Wnt é totalmente diferente do da rota RTK \rightarrow Sos \rightarrow Ras \rightarrow Raf \rightarrow Erk. Lembre-se que fatores Wnt, agindo a partir de receptores Frizzled, suprimem a atividade da glicogênio sintase cinase-3 β (GSK-3 β). Na ausência de Wnts, GSK-3 β fosforila uma série de substratos protéicos chave, que são, portanto, marcados para destruição. O mais importante desses substratos é β -catenina, normalmente uma proteína citoplásmica que existe em três estados. Ela pode estar ligada ao domínio citoplásmico de receptores de adesão célula-célula, como E-caderina (Figura 6.26A). Alternativamente, de forma totalmente desvinculada, ela existe em um reservatório solúvel no citosol, onde se recicla rapidamente, tendo um tempo de vida menor do que 20 minutos. E, finalmente, β -catenina opera no núcleo como um importante componente de um fator de transcrição.

Focamo-nos aqui nos reservatórios de moléculas de β -catenina que não estão associadas à E-caderina. Em geral, logo após sua síntese, a molécula de β -catenina formará um complexo multiprotéico com duas outras proteínas celulares – proteína de polipose adenomatosa de cólon (Apc) e axina –, as quais ajudam a carregar β -catenina junto com sua GSK-3 β executora (Figura 6.26B). Ao fosforilar β -catenina, GSK-3 β garante que β -catenina seja alvejada por **ubiquitilação**, um processo que garante a rápida destruição da β -catenina; isso explica as baixas concentrações em estado estacionário de β -catenina normalmente presentes no citosol. Encontraremos esse sistema de degradação posteriormente em maior detalhe (Barra lateral 7.8).

Entretanto, quando a sinalização de Wnt é ativada, o descarregamento de GSK-3 β é bloqueado, e β -catenina é salva da rápida destruição; sua meia-vida aumenta de menos de 20

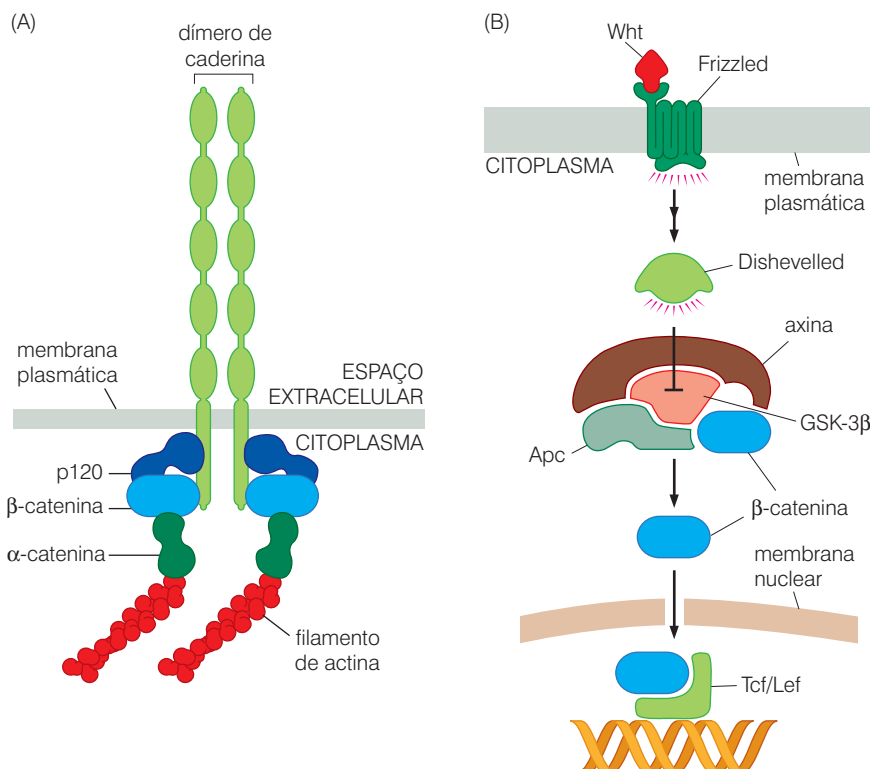


Figura 6.26 Múltiplos papéis da β -catenina (A) Da mesma forma que muitas integrinas, as caderinas (*verde-claro*) são proteínas transmembrana que formam ligações no espaço extracelular e tornam-se ligadas, via proteínas intermediárias, ao citoesqueleto de actina (*vermelho-escuro*). (Por exemplo, moléculas de E-caderina que se salientam a partir de uma célula podem se associar a moléculas de E-caderina de uma célula adjacente, resultando na formação de uma junção aderente entre elas.) Como está apresentado aqui, β -catenina (*azul-claro*) serve como um dos ligantes (assim como α -catenina e p120) que formam a ligação mecânica entre caderinas e o citoesqueleto de actina. (B) Como está indicado na Figura 5.24, as proteínas Wnt (*vermelho-escuro*), ao ligarem-se aos seus receptores Frizzled (*verde-escuro*), agem via Dishevelled para suprimir a atividade de GSK-3 β (*rosa*). Isso previne GSK-3 β de fosforilar, entre outros substratos, β -catenina (*azul-claro*), que, portanto, escapa da degradação e se acumula no citoplasma e no núcleo. Uma vez no núcleo, β -catenina se associa ao fator de transcrição Tcf/Lef para dirigir a expressão de uma variedade de genes responsivos, incluindo aqueles envolvidos em permitir a proliferação celular.

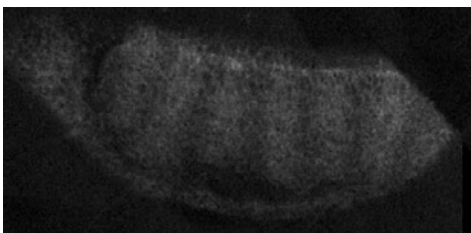
minutos para 1 a 2 horas, e suas concentrações em estado estacionário aumentam proporcionalmente. Muitas das moléculas de β -catenina acumuladas movem-se então para o núcleo para ativar a transcrição ao ligar-se a proteínas Tcf/Lef (veja a Figura 6.26B). Os complexos de fator de transcrição multi-subunidade resultantes passam a ativar a expressão de uma série de importantes genes-alvo, incluindo aqueles que codificam proteínas críticas envolvidas no crescimento e proliferação celular, como ciclina D1 e Myc, que estudaremos no Capítulo 8.

Como foi mencionado, GSK-3 β pode fosforilar outras proteínas importantes reguladoras de crescimento além de β -catenina. Ao fosforilar ciclina D1, GSK-3 β também marca essa proteína promotora de crescimento para rápida degradação. Assim, a rota Wnt modula a expressão de ciclina D1 tanto em nível de transcrição como de pós-tradução. Essas várias ações de Wnt indicam que, além de seus poderes originalmente descobertos como morfógenos, elas também podem agir como potentes mitógenos, de forma semelhante aos ligantes de muitos receptores de tirosina cinase. Além disso, como aprenderemos no Capítulo 7, altos níveis de β -catenina em células-tronco intestinais garantem que estas células permaneçam em um estado indiferenciado, em vez de se desenvolverem em uma célula especializada que reveste a parede do intestino. Esses altos níveis de β -catenina revelam-se como críticos para a formação de carcinomas de cólon.

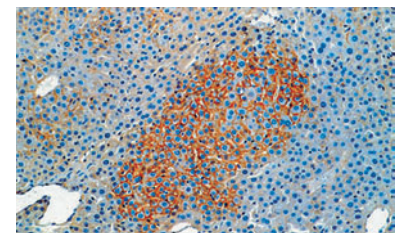
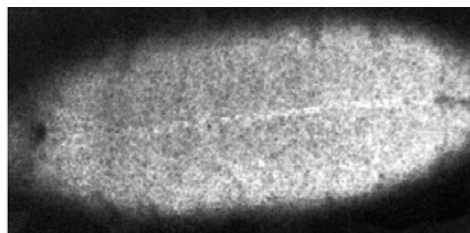
O papel alternativo da β -catenina, anteriormente mencionado, é formar parte do complexo citoplásmico a partir do qual receptores de adesão de superfície celular, como E-caderina, tornam-se fisicamente ligados ao citoesqueleto (veja a Figura 6.26A). Os dois papéis não-relacionados da β -catenina representam um complexo “quebra-cabeça”. Não está claro, por exemplo, se os dois reservatórios de moléculas de β -catenina – aqueles que contribuem para a formação de **junções aderentes** e aqueles envolvidos na regulação da transcrição – estão em equilíbrio um com o outro ou se eles são totalmente segregados em dois compartimentos em desequilíbrio na célula. Portanto, em células que perderam E-caderina, pode-se esperar que β -catenina seja liberada e, assim, torne-se disponível para translocação nuclear e ativação transcricional. Entretanto, em algumas células cancerígenas que perderam seus genes de E-caderina a partir de mutações, sinalização nuclear de β -catenina não parece estar acima dos níveis normais. Observações como essas começam a sugerir que dois reservatórios de β -catenina são independentemente regulados e não influenciam um ao outro. Mas ainda há o outro “quebra-cabeça”: Por que a evolução investiu nessas duas funções não-relacionadas em uma única proteína? (Em vermes, elas são desempenhadas por proteínas distintas codificadas por genes separados.)

Em muitos cânceres mamários humanos, a expressão de certas Wnts é aumentada de 4 a 10 vezes acima do normal, sugerindo a operação de rotas estimulatórias de crescimento autócrinas e parácrinas. Há evidências claras de que há translocação nuclear de β -catenina em cerca de 20% dos carcinomas avançados de próstata. Além disso, em 5 a 7% dos carcinomas de próstata, mutações no gene de β -catenina têm produzido uma proteína que não pode mais ser fosforilada por GSK-3 β , e, como consequência, β -catenina passa a acumular-se em altos níveis no núcleo (veja a Figura 6.27). Tais mutações também foram documentadas em carcinomas de fígado, cólon, endométrio e ovário, assim como em melanomas. E, como veremos no próximo capítulo, em virtualmente todos os carcinomas de cólon, a degradação

Figura 6.27 Regulação da sinalização de β -catenina O aumento dos níveis de β -catenina são resultado de diversos mecanismos. (A) Embriões de *Drosophila* geralmente expressam β -catenina em um padrão listrado (*listras claras, esquerda*). Entretanto, quando o gene que codifica GSK-3 β é inativado, altos níveis de β -catenina são acumulados no embrião (*direita*). (B) Camundongos expostos a certos carcinógenos de fígado desenvolvem carcinomas hepatocelulares (hepatomas) em que os níveis de β -catenina aumentam drasticamente, já que a proteína β -catenina é mutante, permitindo que ela resista a fosforilação por GSK-3 β e resultando em degradação. O acúmulo resultante de β -catenina citoplásmica (*marrom*) nesse foco pré-maligno de hepatócitos é um indicativo para aumentar os níveis de β -catenina nuclear (*não-mostrado*) que dirigem a proliferação celular a partir da associação com fatores de transcrição Tcf/Lef. (A, cortesia de E.F. Wieschaus; B, de T.R. Devereux et al., *Oncogene* 18: 4726-4733, 1999.)



(A)



(B)

de β -catenina é defectiva, devido a defeitos em uma das proteínas – Apc – que facilita sua degradação (veja a Figura 6.26B). É provável que essa rota também seja desregulada em outros cânceres humanos por mecanismos que ainda não foram revelados.

6.11 Receptores acoplados à proteína G também podem dirigir a proliferação normal e neoplásica

Como vimos no capítulo anterior, receptores acoplados à proteína G (GPCRs) são proteínas transmembrana que transpassam a membrana plasmática sete vezes. Ao ligar seus ligantes extracelulares, cada um desses receptores de “serpentina” ativa um ou mais tipos de proteínas G heterotriméricas citoplasmáticas – assim chamadas devido a suas três subunidades distintas ($G\alpha$, $G\beta$ e $G\gamma$) –, a primeira das quais se liga ou a GDP ou a GTP. Da mesma forma que a proteínas Ras, o estado ativado de $G\alpha$ é alcançado quando ele liga GTP.

Uma vez estimulada por uma GPCR, a subunidade $G\alpha$ de uma proteína G heterotrimérica dissocia-se de suas duas parceiras, $G\beta$ e $G\gamma$, e passa a ativar uma série de enzimas citoplásmicas distintas (Figura 6.28). Incluída entre estas estão a adenilato ciclase (que converte ATP em AMP cíclico) e a PLC- β , que cliva PIP_2 para produzir DAG e IP_3 (Figura 6.16B). Este último é um potente mensageiro secundário que pode funcionar para estimular a proliferação celular.

Há evidência de que a Src cinase, a primeira oncoproteína celular a ser estudada, pode ser ativada por certas subunidades $G\alpha$ ligadas a GTP. Ao mesmo tempo, complexos das duas outras subunidades da proteína G heterotrimérica – $G\beta$ e $G\gamma$ – mostraram estimular outras importantes proteínas sinalizadoras mitogênicas, como uma forma de PI3K. A habilidade das GPCRs em ativar rotas mitogênicas sugere que a desregulação da sinalização por esses receptores e proteínas G associadas pode contribuir para a transformação celular e tumorigênese – uma especulação que surgiu a partir de análises de certos tipos de células cancerígenas humanas (veja a Tabela 6.5).

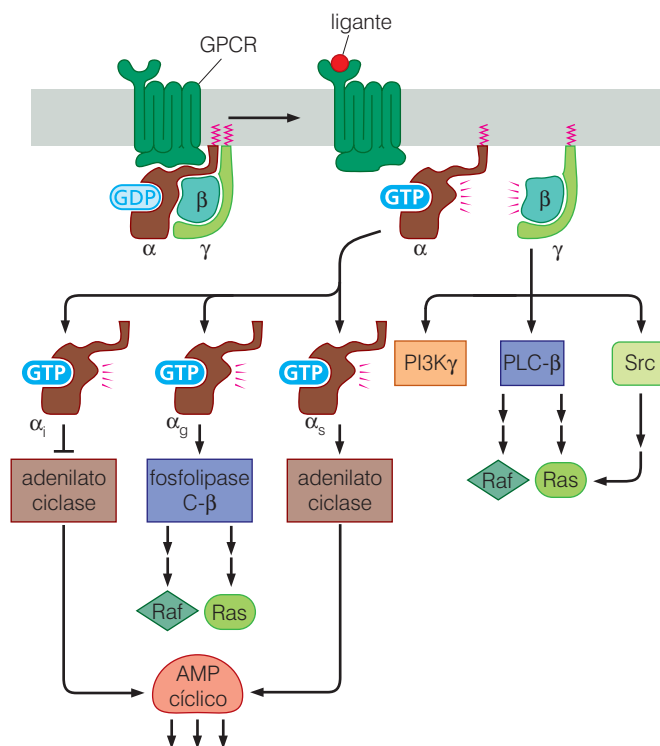


Figura 6.28 Receptores acoplados à proteína G Os receptores que transpassam sete vezes a membrana são capazes de ativar uma variedade de proteínas G heterotriméricas que diferem consideravelmente em identidade de suas subunidades $G\alpha$. Uma vez estimulada por uma GPCR, a subunidade $G\alpha$ separa-se de $G\beta$ e $G\gamma$ e passa a ativar ou inibir uma variedade de enzimas citoplásmicas, apenas duas das quais estão aqui apresentadas (adenilato ciclase e fosfolipase C- β). Essas enzimas, por sua vez, podem ter influências mitogênicas ou antimitogênicas, dependendo do tipo celular. Ao mesmo tempo, os dímeros $G\beta + G\gamma$ podem ativar seus próprios efetores, incluindo PI3K γ , PLC- β e Src. Este diagrama provê apenas uma dica de um diverso espectro de proteínas G e os efetores de $G\alpha$ e $G\beta + G\gamma$ que foram descobertos.

Tabela 6.5 Receptores acoplados à proteína G e proteínas G envolvidas na patogênese do câncer humano

Proteína G ou receptor	Tipos de tumor
Mutações ativadoras que afetam proteínas G	
$G\alpha_s$	adenomas de tireóide e carcinomas, adenomas na glândula pituitária
$G\alpha_{12}$	tumores ovarianos, tumores do córtex adrenal
Mutações ativadoras que afetam receptores acoplados à proteína G	
Receptor de hormônio estimulador de tireóide	adenomas de tireóide e carcinomas
Receptor de hormônio estimulador de folículo	tumores ovarianos
Receptor de hormônio luteinizante	hiperplasias de célula Leydig
Receptor colecistocinina-2	carcinomas colorretais
Receptor sensível a Ca^{2+}	neoplasmas variados
Ativação autócrina e parácrina	
Receptor de neuromedina B	SCLC
Receptor de neurotensina	carcinomas de próstata e SCLC
Receptor de gastrina	carcinomas gástricos e SCLC
Receptor de colecistocinina	hiperplasias pancreáticas e carcinomas
	carcinomas gastrintestinais e SCLC
Receptores acoplados à proteína G codificados por vírus	
Herpesvírus do sarcoma de Kaposi (HHV-8)	sarcomas de Kaposi
Herpesvírus saimiri	leucemias e linfomas de primata
Retrovírus Jaagsiekte de ovelha	carcinomas pulmonares de ovelha

Adaptada de M.J. Marinissen e J.S. Gutkind, *Trends Pharmacol. Sci.* 22: 368-376, 2001.

Por exemplo, as células cancerígenas de carcinoma pulmonar de célula pequena (SCLCs), um tumor comum de fumantes de cigarro, liberam uma série de fatores peptídicos distintos, alguns com propriedades semelhantes a **neuropeptídeos**. Em alguns SCLCs, as células tumorais podem secretar simultaneamente bombesina (também conhecida como peptídeo liberador de gastrina; GPR), bradicinina, colecistocinina (CCK), gastrina, neurotensina e vasopressina. Ao mesmo tempo, essas células apresentam as GPCRs que reconhecem e ligam os fatores liberados, resultando no estabelecimento de alças de sinalização autócrina.

A prova experimental de que essas alças autócrinas são, na verdade, responsáveis por dirigir a proliferação e/ou sobrevivência de células SCLC é direta: células SCLC podem ser incubadas *in vitro* na presença de um anticorpo que liga e neutraliza um fator de crescimento autócrino secretado, como GRP. Em uma série de linhagens celulares SCLC, esse tratamento resulta no rápido encerramento do crescimento e mesmo em apoptose. Tal resposta indica que essas células cancerígenas dependem da alça de sinalização autócrina baseada em GRP para sua sobrevivência e sugere uma nova terapia para pacientes SCLC, que têm sido tratados com um anticorpo neutralizador de GRP. Em uma série de doze pacientes SCLC tratados assim, um paciente apresentou uma completa remissão, enquanto quatro pacientes exibiram uma diminuição parcial de seus tumores.

Em outra classe de neoplasias – adenomas de tireóide e alguns carcinomas de tireóide – o gene codificante do receptor de hormônio estimulador de tireóide (TSHR), outro GPCR, geralmente porta uma mutação pontual. Isso leva ao descarregamento constitutivo independente de ligante do receptor de TSH, que, por sua vez, resulta na liberação de fortes sinais mitogênicos nas células epiteliais de tireóide (veja a Tabela 6.5). Em outros tumores da glândula tireóide, uma subunidade $G\alpha$ sofreu uma mutação pontual que funciona de forma semelhante às mutações que ativam a sinalização Ras, ao privar essa subunidade $G\alpha$ da habilidade de desligar-se a partir da sua atividade GTPase intrínseca. Assim, pelo menos 10 dos 17 genes humanos que codificam subunidades $G\alpha$ parecem funcionar como oncogenes em certos tipos celulares e em várias malignidades humanas.

A mais bizarra subversão desses receptores acoplados à proteína G ocorre durante infecções por certos herpesvírus, como HHV-8, também conhecido como KSHV (veja a Barra lateral 3.10). Esse vírus é responsável pelos tumores vasculares que freqüentemente afligem pacientes com AIDS. Em certo ponto no passado evolutivo, o HHV-8 adquiriu um gene

celular que especificava um receptor acoplado à proteína G. A forma viral desse gene foi remodelada, de forma que o receptor codificado sinaliza de forma independente do ligante. Entre outras consequências, essa sinalização causa a secreção de fator de crescimento de endotélio vascular (VEGF) por células endoteliais infectadas por HHV-8 (revestindo as paredes dos vasos sanguíneos); os VEGFs liberados criam então uma alça de sinalização autócrina ao ligar-se aos seus receptores cognatos na superfície dessas células endoteliais e dirigindo a proliferação delas.

6.12 Quatro outras rotas de sinalização contribuem de várias formas para a proliferação normal e neoplásica

Quatro outros canais de sinalização desempenham papéis importantes na patogênese de alguns tipos de câncer. Essas rotas compartilham um fato comum: quando ativadas, controlam a localização intracelular de proteínas de “duplo endereço” que operam de forma semelhante a β -catenina – essas proteínas residem normalmente no citoplasma e, quando ativadas por certos sinais, são enviadas para o núcleo, onde funcionam como componentes de fatores de transcrição específicos para dirigir a expressão gênica. No capítulo anterior, vimos descrições de como os receptores que controlam tais rotas operam. Agora, resumiremos brevemente as ações *downstream* das quatro rotas (Figura 6.29) e citaremos exemplos de como cada uma é regulada em um ou outro tipo de tumor humano (Figura 6.30).

Fator nuclear κB O sistema de sinalização envolvendo fatores de transcrição da classe do fator nuclear κB (NF- κB) contribui para a formação de certos tipos tumorais. A primeira indicação da importância dessa rota para a patogênese do câncer veio do descobrimento do oncogene *rel* em um retrovírus de peru de rápida transformação responsável pela reticuloendoteliose, um linfoma da linhagem de células B. Investigações posteriores sobre os fatores de transcrição responsáveis por regular a expressão gênica de imunoglobulina revelaram que Rel é um membro de uma família de fatores de transcrição que veio a ser chamada coletivamente de NF- κBs . Essas proteínas formam homo e heterodímeros no citoplasma.

A forma mais comum de NF- κBs é um heterodímero composto por uma subunidade p65 e uma p50. Geralmente, NF- κB é sequestrado no citoplasma por um terceiro polipeptídeo, denominado inibidor de NF- κBs (I κB ; Figura 6.29A); enquanto está nesse estado, o sistema de sinalização é mantido em silêncio. Entretanto, em resposta a sinais originários de um diverso espectro de fontes, I κB torna-se fosforilado e, portanto, torna-se marcado para rápida destruição. (Lembre-se que β -catenina sofre o mesmo destino após sua fosforilação no citoplasma.) Como resultado, NF- κB é liberado das garras de I κB , migra para o núcleo e passa a ativar a expressão de um grupo de pelo menos 150 genes-alvo.

A cinase que marca I κB para destruição (chamada I κB cinase ou simplesmente IKK) e, portanto, ativa a sinalização de NF- κB é por si só estimulada por sinais tão diversos como fator de necrose tumoral α e interleucina-1 β (fatores extracelulares envolvidos na resposta inflamatória do sistema imunológico), lipopolissacarídeo (um sinal de infecção bacteriana), espécies reativas de oxigênio (ROS), drogas anticâncer e irradiação gama. No contexto de câncer, NF- κBs têm importantes efeitos na sobrevivência e proliferação celular. Após chegarem ao núcleo, NF- κBs podem induzir a expressão de genes que especificam uma série de proteínas antiapoptóticas chave, como Bcl-2 e IAP-1 e 2; aprenderemos mais sobre tais proteínas no Capítulo 9. Ao mesmo tempo, NF- κB funciona de forma mitogênica ao induzir a expressão de *myc* e genes de ciclina D1, componentes da maquinaria de ciclo celular que discutiremos no Capítulo 8. Assim, NF- κB pode proteger células cancerígenas da apoptose (morte celular programada) e, ao mesmo tempo, dirigir sua proliferação.

Enquanto componentes da cascata de sinalização NF- κB são raramente encontrados na forma mutante em cânceres humanos, essa rota é com frequência encontrada como sendo constitutivamente ativa. Em cânceres mamários, por exemplo, ela em geral é bastante ativa, ainda que o mecanismo molecular responsável por essa ativação permaneça obscuro. NF- κB parece desempenhar seu papel mais importante em malignidades de várias

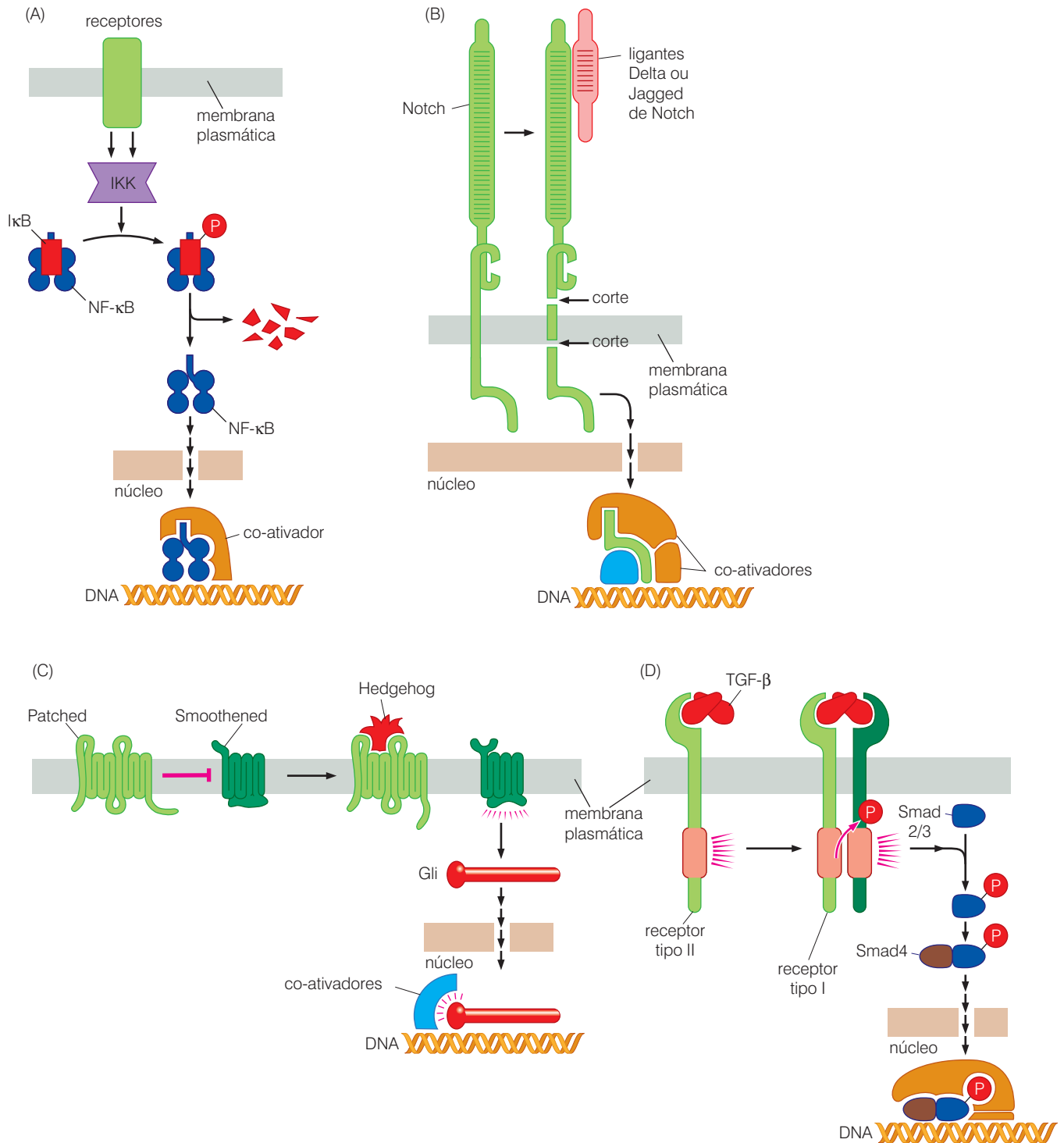


Figura 6.29 Quatro diferentes rotas sinalizadoras de “duplo endereço”

(A) A família NF-κB de fatores de transcrição, que funcionam como heterodímeros (azul), é seqüestrada no citoplasma por IκB. Uma variedade de receptores e sinais aferentes ativa IKK, que fosforila IκB, marcando-o para degradação proteolítica. Então, liberado de IκB, NF-κB pode translocar para o núcleo, onde ativa uma ampla constituição de genes, incluindo genes antiapoptóticos e mitogênicos (*não-apresentado*). (B) O receptor Notch na superfície celular pode ligar ligantes como NotchL, Delta e Jagged. A ligação do ligante causa dois cortes proteolíticos em Notch, liberando um fragmento citoplásmico de Notch que pode translocar para o núcleo, onde funciona como parte de

um complexo de fator de transcrição. (C) A ligação de um ligante Hedgehog em Patched faz com que o segundo libere Smoothened. Uma vez livre, Smoothened previne a clivagem de uma proteína Gli, e a última é então translocada para o núcleo, onde ajuda a formar fatores de transcrição funcionais. (D) A ligação do ligante TGF-β ao receptor tipo II, que traz os receptores tipo II e I juntos, resulta na fosforilação do receptor tipo I. Este último, agora ativado, fosforila as proteínas citosólicas Smad2 ou Smad3, e qualquer uma dessas fosfo-Smads liga-se então a Smad4. Os complexos heterodiméricos de Smad resultantes translocam para o núcleo, onde formam complexos com outros fatores de transcrição para dirigir a expressão gênica.

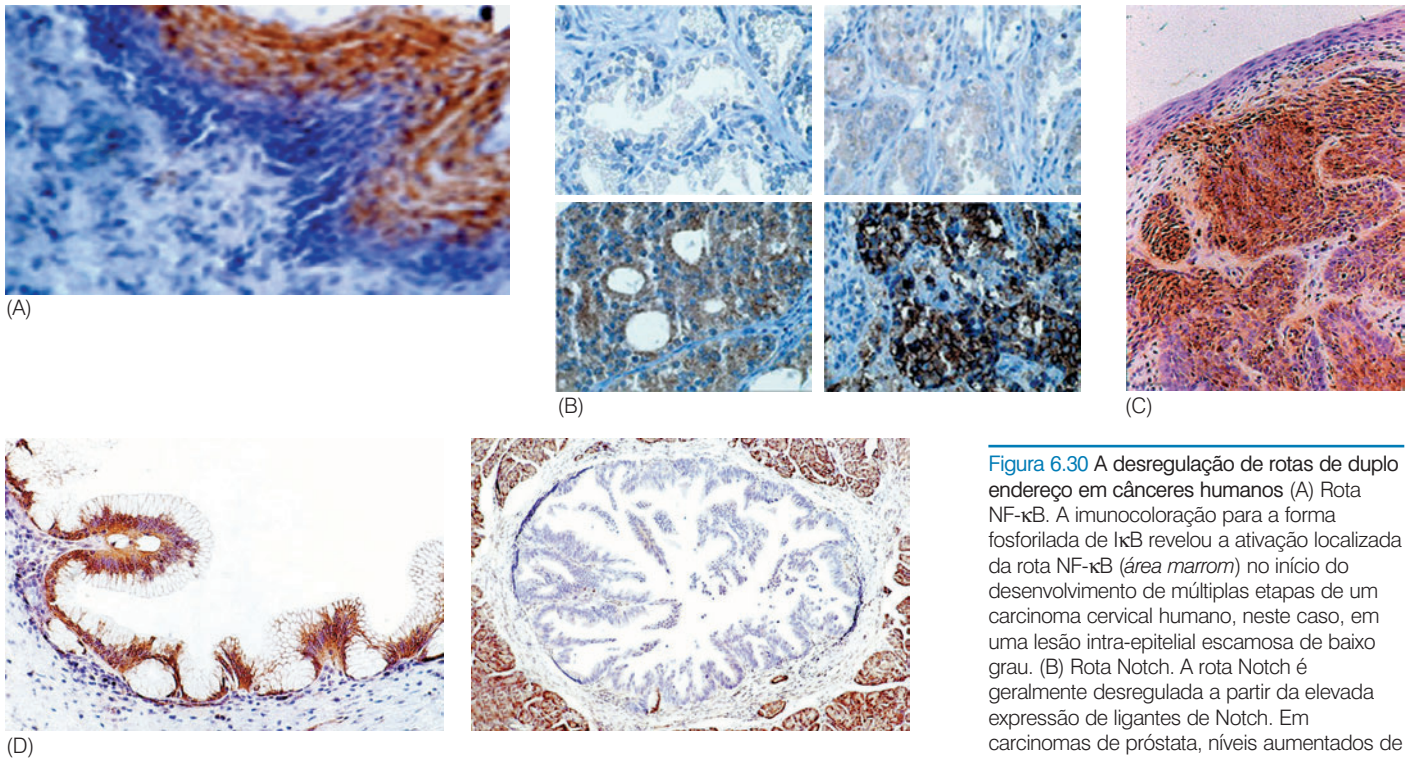


Figura 6.30 A desregulação de rotas de duplo endereço em cânceres humanos (A) Rota NF- κ B. A imunocoloração para a forma fosforilada de I κ B revelou a ativação localizada da rota NF- κ B (área marrom) no início do desenvolvimento de múltiplas etapas de um carcinoma cervical humano, neste caso, em uma lesão intra-epitelial escamosa de baixo grau. (B) Rota Notch. A rota Notch é geralmente desregulada a partir da elevada expressão de ligantes de Notch. Em carcinomas de próstata, níveis aumentados de Jagged, um ligante do receptor de Notch, são observados com níveis aumentados da malignidade. Nesta figura pode ser observado (marrom, da esquerda para a direita, seqüência superior) a imunocoloração de uma próstata normal e um carcinoma primário; e (da esquerda para a direita, seqüência inferior) de uma metástase que não foi tratada com terapia de hormônio anti-androgênio e uma metástase que tornou-se resistente a terapia de hormônio. A expressão elevada de Jagged em tumores primários está correlacionada com o risco aumentado de relapso metastático. (C) Rota Hedgehog. Essa rota está desregulada na maioria dos carcinomas de pele de células basais (BCC). Sua desregulação está indicada pela elevada concentração da proteína Gli1 em BCCs, detectada aqui por imunocoloração (marrom), que é quase indetectável em células normais (rosa-claro). Análises por Northern blot (RNA) (não-apresentadas) indicam uma elevação de até 40 vezes de mRNA Gli1 em BCCs em comparação com a pele normal. (D) Rota TGF- β . Essa rota está inativada em uma grande variedade de carcinomas a partir de uma série de mecanismos. Durante a progressão de carcinoma pancreático, neoplasias intra-epiteliais pancreáticas de baixo grau (PanIN-1) geralmente expressam Smad4, um fator de transcrição crítico na sinalização de TGF- β (marrom, painel esquerdo), enquanto lesões PanIN-3 de alto grau geralmente perdem a expressão de Smad4, principalmente devido a mutações do gene codificante (centro do painel direito). (A, de A. Nair et al., *Oncogene* 22: 50-58, 2003; B, de S. Santagata et al., *Cancer Res.* 64: 6854-6857, 2004; C, de L. Ghali et al., *J. Invest. Dermatol.* 113: 595-599, 1999; de R.E. Wilentz et al., *Cancer Res.* 60: 2002-2006, 2000.)

linhagens de linfócitos. O gene *REL*, que codifica uma das subunidades de NF- κ B, é amplificado em cerca de um quarto de linfomas grandes e difusos de células B, resultando em um aumento de 4 a 35 vezes na expressão de seu produto gênico. As translocações que afetam o loco *NFKB2* foram freqüentemente encontradas em linfomas de célula B e T e em mielomas (tumores de células produtoras de anticorpo). A desregulação dessa rota pode ser freqüentemente observada já em crescimentos pré-malignos de alto grau (Figura 6.30A).

Notch O estudo de outra rota de sinalização incomum, esta controlada pela proteína Notch, traça suas raízes no descobrimento, em 1919, de um alelo de um gene de *Drosophila* que causa fendas nas extremidades das suas asas. Somente muitas décadas depois foi possível se perceber que Notch é uma proteína transmembrana; quatro diferentes variedades de Notch (produtos de quatro diferentes genes) são expressos por células de mamífero. Como foi mencionado no capítulo anterior, depois que Notch (que atua como um receptor de superfície celular) liga um ligante (NotchL), ele é submetido a duas clivagens proteolíticas, uma em seu ectodomínio e a outra no seu domínio transmembrana. Esta segunda clivagem libera um grande fragmento protéico citoplásmico da sua ligação à membrana plasmática, o qual migra então para o núcleo da célula alvejada, onde funciona, junto com proteínas parceiras, como um fator de transcrição (Figura 6.29B).

O sistema de sinalização opera utilizando mecanismos bioquímicos que são muito diferentes daqueles que governam a sinalização por receptores de tirosina cinase. Cada vez que um receptor de Notch liga seu ligante, seu receptor submete-se a uma alteração covalente irreversível, mais especificamente, uma clivagem proteolítica. Assim, o descarregamento do receptor ocorre na proporção direta ao número de ligantes encontrados no espaço extracelular, e cada receptor de Notch pode, presumivelmente, descarregar apenas uma vez após ligar-se ao seu ligante. Receptores de tirosina cinase, em contraposição, liberam sinais múltiplos sobre um estendido período após a ligação do ligante e, portanto, podem amplificar consideravelmente o sinal iniciado pelos seus ligantes de fator de crescimento.

Formas truncadas de *Notch* que especificam apenas o domínio citoplásmico da proteína Notch são potentes oncogenes para transformar células *in vitro*. Isso sugere que formas alteradas de Notch contribuem para a patogênese do câncer humano. De fato, a superexpressão de uma ou outra das proteínas Notch é observada na grande maioria de carcinomas cervicais, em um subgrupo de carcinomas de cólon, e em carcinomas pulmonares escamosos. Essa superexpressão é geralmente acompanhada pela localização nuclear do fragmento citoplásmico clivado de Notch, indicando que a sinalização ativa a partir dessa rota está ocorrendo em células tumorais. A expressão aumentada de dois ligantes de Notch, chamados Jagged e Delta, também foi encontrada em alguns carcinomas cervicais e de próstata (Figura 6.30B). Além disso, em aproximadamente 10% das leucemias linfocíticas (ou linfoblásticas) agudas (ALLs), formas constitutivamente ativas de Notch são encontradas; estas resultam das deleções genéticas da porção do gene *NOTCH-1* que codifica o domínio extracelular da proteína Notch-1. Alguns experimentos também sugerem que a sinalização de Notch contribui de formas importantes para a transformação por oncogenes *ras*.

Patched Como discutimos previamente, a ligação do receptor Patched por seu ligante, Hedgehog, faz com que Patched libere a proteína Smoothened da inibição; Smoothened é então capaz de emitir sinais *downstream*. A partir de uma série de mudanças pouco compreendidas, a proteína Smoothened ativada altera o destino da proteína citoplásmica Gli. Normalmente, na ausência de intervenção por Smoothened, a proteína precursora Gli é clivada em dois fragmentos, e um move-se para o núcleo, onde funciona como repressor transcrricional. Entretanto, quando Smoothened é ativada, ela protege o precursor de Gli da clivagem. A proteína Gli intacta resultante migra para o núcleo, onde serve como um ativador da transcrição (Figura 6.29C).

Gli foi primeiramente descoberta como uma proteína altamente expressa em glioblastomas (por isso o nome). Quando superexpressas, Gli e algumas outras proteínas similares podem funcionar como oncoproteínas. Pesquisas subsequentes envolvendo a rota Patched revelaram outras instâncias em que seu mau funcionamento contribui para o desenvolvimento de tumores. Por exemplo, mutações inativadoras da linha germinativa do gene humano *patched* (*PTCH*) causam a síndrome Gorlin, uma síndrome de suscetibilidade de câncer hereditária, que envolve risco aumentado de carcinomas celulares basais múltiplos da pele assim como outros tumores, notavelmente meduloblastomas – tumores celulares no cerebelo. Tais mutações inativadoras previnem Patched de inibir Smoothened, deixando esta última livre para despachar uma ininterrupta corrente de proteínas Gli ativas para o núcleo.

Até 40% de carcinomas celulares basais esporádicos da pele (que ocorrem devido a mutações somáticas em vez de mutações nas linhas germinativas) portam alelos mutantes *PTCH* ou *SMO* – o segundo codificando Smoothened. Esses carcinomas celulares basais são a forma mais comum de câncer nas populações ocidentais e, felizmente, em geral são benignos (Figura 6.30C). Alelos somaticamente mutados de *PTCH* também foram encontrados em uma variedade de outros tumores, incluindo meduloblastomas e meningiomas, assim como carcinomas mamários e de esôfago. Essas mutações somáticas, da mesma forma que aquelas presentes em alelos mutantes de *PTCH* de linhagem germinativa, parecem comprometer a função de Patched, permitindo novamente que Smoothened ative constitutivamente fatores de transcrição Gli. Recentemente, alelos mutantes de outro componente *downstream* dessa rota, codificados pelo gene *SUFU*, também foram descritos em meduloblastomas. Além disto, está agora claro que existem pelo menos três proteínas Gli, duas das quais estimulam a transcrição, enquanto a terceira a inibe.

Esses cânceres, todos envolvendo mutações que afetam a estrutura de vários componentes da rota Patched, parecem representar apenas uma pequena porção dos tumores humanos em que essa cascata de sinalização está hiperativada. Portanto, uma análise dos carcinomas de linhas celulares e tumores de esôfago, gástricos, do trato biliar e pancreático revelaram que virtualmente todos estes expressaram níveis significativos do receptor Patched assim como de seus ligantes (chamados tanto de Sonic Hedgehog como Indian Hedgehog), indicando as

operações de uma alça de sinalização autócrina. Tal noção foi confirmada ao demonstrarem-se níveis nucleares elevados do fator Gli, o produto *downstream* da rota ativada. Além disso, o tratamento de células tumorais com anticorpo anti-Hedgehog (que seqüestra os dois tipos de ligantes e quebra a alça sinalizadora) causou a interrupção da proliferação e/ou morte das células tumorais. Achados similares foram reportados para SCLCs, a malignidade comum entre fumantes de cigarro. Assim, esses relatórios apontam para um importante papel da rota de sinalização Patched nos tumores que surgem em muitos dos tecidos derivados do tecido embrionário.

TGF- β Uma quarta rota de sinalização que envolve o despachamento de proteínas citoplásmicas para o núcleo está representada pela rota a partir dos receptores de TGF- β (Seção 5.7). TGF- β e a rota de sinalização que ele controla parecem desempenhar um papel fundamental na patogênese de muitos, senão todos, carcinomas, ambos em seus estágios primários, quando TGF- β age para prender o crescimento de muitos tipos celulares, e posteriormente na progressão de câncer, quando contribui, paradoxalmente, para o fenótipo de invasividade tumoral. Deferiremos discussões detalhadas dessa importante rota até a Seção 8.10 e o Capítulo 14. Por enquanto, basta dizer que a sua ativação leva ao despachamento de fatores de transcrição Smad para o núcleo, onde eles podem colaborar com outros fatores de transcrição nucleares para ativar a expressão de um grande “eleitorado” de genes (Figura 6.29D). Na ausência de Smads críticos, células cancerígenas epiteliais podem escapar às ações inibidoras de crescimento de TGF- β e ter sucesso – um estado que é geralmente observado nos precursores de carcinomas pancreáticos humanos invasivos (Figura 6.30D).

6.13 Sinopse e perspectivas

Transdução de sinal em células cancerígenas Um dos marcos de células cancerígenas é sua habilidade em gerar seus próprios sinais mitogênicos endogenamente. Tais sinais permitem que células cancerígenas se libertem da dependência de sinais mitogênicos externos, mais especificamente aqueles conduzidos por fatores de transcrição. É possível que a rota mitogênica de maior importância para a patogênese do câncer humano seja aquela que discutimos em detalhe e tem o seguinte desenho:

$$\text{GFs} \rightarrow \text{RTKs} \rightarrow \text{Grb2} \rightarrow \text{Sos} \rightarrow \text{Ras} \rightarrow \text{Raf} \rightarrow \text{MEK} \rightarrow \text{ERK}$$

Como foi descrito no capítulo anterior e neste, uma variedade de mecanismos moleculares fazem com que a porção *upstream* dessa rota de sinalização se torne continuamente ativada em células cancerígenas. Células neoplásicas podem adquirir a habilidade de produzir e liberar fatores de crescimento (GFs) que iniciam alças de sinalização autócrina. Alternativamente, os receptores de fator de crescimento (RTKs) podem sofrer alterações estruturais significativas. No caso do receptor EGF, a deleção de boa parte de seu ectodomínio, observada em alguns tumores humanos como glioblastomas, resulta no descarregamento independente de ligante de sua tirosina cinase citoplásmica.

Ainda mais comumente observados são os tumores humanos que têm níveis elevados de versões tipo selvagem de receptores como EFG ou seu parente próximo, ErbB2/HER2/Neu. Está claro que níveis excessivamente altos dessas moléculas receptoras, em geral expressas em células cancerígenas mamárias, cerebrais e estomacais, favorecem a proliferação celular aumentada. Tal superexpressão de receptor é geralmente obtida a partir da amplificação do gene que codifica esse receptor ou da transcrição desregulada desse gene.

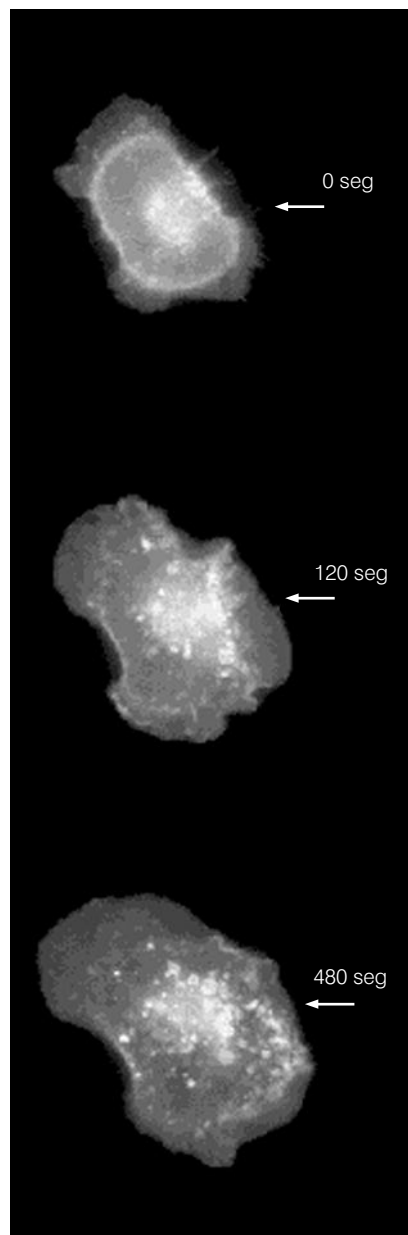
O fluxo de sinais a partir da rota $\text{RTK} \rightarrow \text{Ras} \rightarrow \text{Raf} \rightarrow \text{MAPK}$ também é regulado por mecanismos de retroalimentação negativa que operam para atenuar a sinalização. Por exemplo, após EGF-R ligar um ligante, o complexo receptor-ligante é **internalizado** na célula via um processo de endocitose (Figura 6.31). Uma vez seqüestrado em vesículas da membrana citoplásmica, o receptor pode ser direcionado aos lisossomos, onde é degradado ou novamente reciclado para a superfície. A internalização defectiva desse receptor lhe permite acumular-se

em níveis excessivamente altos na superfície celular, produzindo uma sinalização mitogênica consideravelmente alta. A internalização defectiva de EGF-R e, por extensão, de outras RTKs pode desempenhar um papel-chave em dirigir a proliferação de muitos tipos de células tumorais humanas.

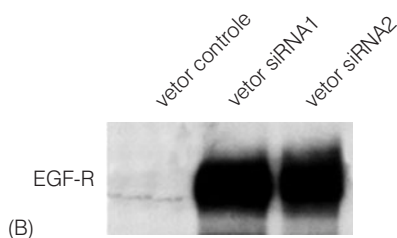
Olhando para baixo na rota mitogênica dos receptores, podemos notar que poucas, se alguma, alterações em proteínas transdutoras de sinal foram documentadas em tumores humanos até alcançarmos as proteínas Ras. Lembre-se que mutações pontuais nos códons 12, 13 ou 61 das fases de leitura dos genes codificantes *ras* resultam em oncoproteínas Ras ativadas. Essas proteínas mutantes descarregam por extensos períodos, em vez dos pequenos e bem-controlados estouros que caracterizam o comportamento de proteínas Ras normais. As reposições de aminoácidos causadas por essas várias mutações pontuais (que são vistas em mais de um quinto de todos os cânceres humanos) fazem com que as proteínas Ras tornem-se resistentes às proteínas ativadoras de GTPase (GAPs), que normalmente estimulam a atividade GTPase de Ras. Como será discutido no Capítulo 7, na doença chamada neurofibromatose, uma das GAPs que em geral servem para inativar Ras foi perdida em certos tipos celulares, resultando, mais uma vez, em um acúmulo de níveis excessivamente altos de proteínas Ras ativadas e na forma ligada a GTP.

Ainda mais abaixo nessa cascata de sinalização linear, abaixo do nível de Ras, encontraremos, mais uma vez, uma certa carência de proteínas mutantes em células cancerígenas humanas. A proteína B-Raf, um parente próximo da cinase Raf, apresenta uma exceção a essa regra. É encontrada na forma mutante em cerca de 8% de um grande espectro de linhas de tumores humanos que foram examinados. Além disso, até dois terços dos melanomas possuem versões pontualmente mutadas do gene *BRAF*, cujo produto normal, da mesma forma que Raf, necessita da estimulação de Ras antes de poder ser descarregada. As proteínas mutantes B-Raf têm uma dependência consideravelmente reduzida na interação com Ras.

Outra exceção é provida pela PI3K, que também opera imediatamente *downstream* de Ras. Lembre que a enzima PI3K é ativada por Ras, por receptores de fator de crescimento ou pelos dois, agindo de forma concertada. Seu produto é PIP_3 . Em certos carcinomas de ovário e de cólon, uma subunidade de PI3K pode estar presente na forma mutante. A inibição dessa rota é defectiva: os níveis de PIP_3 são normalmente controlados pelas ações da fosfatase PTEN, que, com frequência, é perdida em certos tipos de



(A)



(B)

Figura 6.31 Controle de retroalimentação negativa da sinalização do receptor A sinalização mitogênica é abreviada por alças de retroalimentação negativa que garantem que células sejam submetidas a doses fisiologicamente apropriadas de tais sinais. (A) A maioria dessas alças de retroalimentação negativa é de difícil visualização por microscopia. Uma exceção pode ser observada aqui. Quando uma célula é exposta a EGF, introduzida no meio a partir de uma micropipeta cuja localização está apresentada (setas), os EGF fazem, inicialmente, com que o receptor EGF de superfície celular, que neste caso foi ligado a um corante fluorescente, libere sinais mitogênicos na célula (*não-apresentado*). Entretanto, em menos de 120 segundos, o EGF-R fluorescente é internalizado no lado da célula voltado para a fonte de EGF, e, em 480 segundos, é encontrado em agrupamentos de internalizações em todos os lados da célula. Assim, a sinalização de EGF é desligada devido à indisponibilidade do receptor para ligar ligante na superfície celular. (B) A potente contribuição de controles de retroalimentação negativa na expressão do receptor pode ser revelada a partir de um experimento em que a expressão da cinase associada à ciclina G (GAK) é suprimida a partir das ações de dois vetores expressando RNA de interferência (RNAi). Em tais células, a expressão normal do receptor EGF, como medido neste *immunoblot* (canal esquerdo), é aumentada 50 vezes quando um dos dois RNAs é expresso nestas células (os dois canais à direita). GAK age de formas ainda não claras para dirigir a internalização dessa proteína e de outras de superfície celular. (A, de M. Bailly et al., *Mol. Biol. Cell* 11: 3873-3883, 2000; B, adaptada de L. Zhang et al., *Proc. Natl. Sci. USA* 101: 10296-10301, 2004.)

Barra lateral 6.5 Os mistérios da mitogênese do câncer mamário O câncer mamário é uma doença de ocorrência comum no ocidente que tem sido tema de extensa pesquisa, mas ainda temos apenas uma vaga compreensão em nível molecular de como o crescimento da maioria dos tumores é controlado. A maioria dos cânceres mamários expressa o receptor de estrogênio (ER), que age a partir de mecanismos muito diferentes daqueles de outros receptores que estudamos. Da mesma forma que outros “receptores nucleares”, ER liga seu ligante, estrogênio (estradiol, mais precisamente), e passa então a ligar-se a seqüências de DNA específicas nos promotores de certos genes-alvo; essa ligação, seguida pela associação de co-reguladores transcricionais, leva à transcrição desses genes.

O estrogênio age como um importante mitógeno crítico para células de câncer mamário ER-positivas. Isso está indicado pelo fato de que uma série de “antiestrogênios”, como tamoxifeno, que se liga ao ER e bloqueia alguns de seus poderes ativadores de transcrição, previne o crescimento de células ER-positivas e tumores, e pode causar regressão tumoral. Entretanto, nada disso parece explicar precisamente como o estrogênio e o ER dirigem a proliferação de células

de câncer mamário ER-positivas. Poucos minutos após a adição de estrogênio nessas células, a cascata de sinalização Ras → MAPK é ativada. Essa resposta rápida não pode ser explicada pelo fato de que ER age como um fator de transcrição nuclear, já que modificações na transcrição gênica nuclear não são sentidas no citoplasma (na forma de proteínas sintetizadas em RNAs moldes recém-formados) por pelo menos meia hora.

Uma pista crítica pode vir da observação de que algumas das moléculas ER ativadas por ligante encontram-se ligadas a membranas citoplásmicas em vez de estarem localizadas em seus sítios usuais de ação no núcleo. Após a ligação do ligante, uma parte desse ER citoplásmico se liga a Shc, a importante proteína carreadora contendo SH2 e SH3 que participa da ativação de SOS e sinalização de Ras. A associação ER-Shc, ainda pouco compreendida, pode explicar como cascatas de sinalização mitogênicas citoplásmicas são ativadas por estrogênio. Essa descrição fragmentada de uma grande rota mitogênica não é esperada na maioria das vezes, à luz do fato de que câncer mamário tem, até agora, sido estudado com mais intensidade do que qualquer outro tipo de malignidade humana.

cânceres. De fato, a perda de PTEN pode ser tão efetiva para o aumento dos níveis de PIP₃ quanto a hiperatividade do PI3K que é induzida pelas oncoproteínas Ras. Os níveis aumentados PIP₃ causam a ativação de Akt/PKB, que, por sua vez, tem grandes efeitos na sobrevivência, crescimento e proliferação celular.

Os dados disponíveis sugerem que a rota de sinalização desde os fatores de crescimento, passando por Ras até os ERKs (incluindo sua ramificação lateral envolvendo PI3K) representa a rota mitogênica dominante na maioria dos tipos de células não-hematopoiéticas pelo corpo. Essa proeminência é refletida no envolvimento freqüente dessa rota, na forma desregulada, em cânceres humanos. Além disso, existem outros candidatos na fila. Pesquisas futuras poderão revelar que outras rotas, como as quatro mencionadas neste capítulo (envolvendo GPCRs, Patched, Notch e NF-κB), desempenham um papel dominante em prover os sinais mitogênicos que dirigem a proliferação celular em certos tipos de tumores de ocorrência freqüente, questionando assim a importância da rota RTK/Ras. O desenho da principal rota mitogênica que opera nos cânceres mamários positivos para o receptor de estrogênio de ocorrência comum ainda é pouco compreendido (Barra lateral 6.5).

Organização das rotas de sinalização mitogênica Voltando atrás nos detalhes da desregulação de rotas de sinalização mitogênica em cânceres humanos, podemos esboçar mais algumas lições gerais sobre o desenho dessas rotas e como essa organização afeta a patogênese do câncer humano. A evolução pode ter construído metazoários tão complexos quanto nós ao utilizar um pequeno número de rotas de sinalização celular (ou mesmo apenas uma) para regular a proliferação de células individuais em vários tecidos. À medida que isso aconteceu, um plano de desenho foi reunido: cada uma de nossas células utiliza um número distinto de rotas de sinalização para controlar sua proliferação (com uma dessas, envolvendo receptores de tirosina cinase, desempenhando um papel especialmente proeminente).

Em cada tipo de célula, as rotas de sinalização funcionam de forma combinada para garantir que a proliferação ocorra no lugar certo e na hora certa durante o desenvolvimento e, no adulto, durante a manutenção e reparação tecidual. Diferentes tipos celulares utilizam diferentes combinações de rotas para regular seu crescimento e divisão. Isso ajuda a explicar por que a bioquímica do câncer, como descrita neste capítulo, é tão complexa.

Essa bioquímica de transdução de sinal é organizada a partir de um pequeno número de princípios básicos e um grande número de detalhes idiossincráticos, uma colcha de retalhos. Muitos desses detalhes representam uma solução *ad hoc* para problemas biológicos e fisiológico-celulares que foram escolhidos durante a evolução metazoária inicial há 600 ou 700 milhões de anos; algumas dessas soluções remetem às origens dos eucariotos, há quase um bilhão de anos. Uma vez agrupadas, tais soluções tornaram-se “fixas” e relativamente imutáveis, somente porque outras inovações desenvolvidas subsequentemente dependiam delas. (Para garantir, o produto final de todas essas soluções – uma maquinaria otimizada para um desenvolvimento normal e um tempo de vida saudável – geralmente funciona maravilhosamente bem. Durante um ciclo de vida humana médio, as células dentro do corpo cumulativamente passam por cerca de 10^{16} ciclos de crescimento e divisão e, no caso da maioria de nós, provê excelente saúde – algo a que devemos agradecer.)

O circuito de sinalização que foi descrito neste capítulo opera principalmente no citoplasma e recebe sinais dos receptores de superfície celular – aqueles que ligam ligantes extracelulares solúveis, principalmente fatores de crescimento, ou componentes da matriz insolúveis (as integrinas). Ao receber uma mistura complexa de sinais **aférentes** (de chegada) de tais receptores, esse circuito citoplasmático emite sinais a alvos moleculares tanto no citoplasma quanto no núcleo.

Entre os alvos citoplasmáticos estão os reguladores do formato e motilidade celular, o metabolismo energético, a síntese protéica e a maquinaria apoptótica, que decide a vida e a morte celular. Os sinais **eférentes** (de saída) remanescentes são transmitidos para o núcleo, onde modulam a transcrição de milhares de genes envolvidos na programação do crescimento e diferenciação celular, assim como na progressão do ciclo celular. Retornaremos a muitos desses temas posteriormente. Assim, a regulação do ciclo e diferenciação celular serão descritos no Capítulo 8, enquanto a regulação da morte celular programada – apoptose – será apresentada no Capítulo 9. Os reguladores da motilidade celular serão descritos em destaque no Capítulo 14.

Alguns temas importantes foram retomados ao longo deste capítulo. Em destaque, estão as três vias pelas quais os sinais são transduzidos ao longo das rotas de sinalização de células normais e neoplásicas. Primeiramente, a *atividade intrínseca* das moléculas sinalizadoras pode ser modulada. Isso pode ser realizado por modificações não-covalentes (a ligação de GTP por Ras, por exemplo) ou dimerização do receptor. Alternativamente, uma molécula sinalizadora pode ser covalentemente modificada; a fosforilação de MEK por Raf, a fosforilação de PIP_2 por PI3K e a clivagem proteolítica de Notch são três exemplos disso.

Segundo, a *concentração* de uma molécula sinalizadora pode ser modulada, geralmente por ordens de magnitude. Portanto, a concentração de β -catenina é bastante reduzida pela fosforilação de GSK-3 β , e a concentração de PIP_3 é regulada tanto por PI3K (positivamente) quanto por PTEN (negativamente).

Terceiro, a *localização* intracelular das moléculas sinalizadoras pode ser regulada, o que resulta em movimentá-las de um sítio onde são inativas a um novo sítio, no qual podem exercer seu trabalho. Os exemplos mais dramáticos disso derivam da fosforilação de receptores de tirosina cinases (RTKs) e a subsequente atração de múltiplas moléculas contendo SH2 distintos às fosfotirosinas resultantes. Uma vez ancoradas em tais receptores, muitas dessas moléculas transdutoras de sinal são aproximadas a outras moléculas que estão associadas à membrana plasmática; exemplos deste último são a molécula Ras (alvo da ação de Sos) e PIP_2 (alvo da ação de PI3K).

A translocação de moléculas citoplasmáticas para o núcleo é outra manifestação dessa terceira classe de mecanismos regulatórios. Por exemplo, neste capítulo, lemos sobre uma série de proteínas distintas, denominadas fatores de transcrição de “duplo endereço”, que existem em formas inativas no citoplasma e podem ser emitidas como fatores de transcrição ativos (ou

componentes destes) ao núcleo. Alguns exemplos disso incluem β -catenina, NF- κ B, os Smads, Notch, Gli e os STATs.

A cinética com que os sinais são transduzidos de um sítio para outro em uma célula também pode variar consideravelmente. Um mecanismo muito rápido envolve as ações das cascatas de cinase. Portanto, as MAP cinases citoplasmáticas (MAPKs), incluindo Erks que estão no final dessas cascatas, são ativadas quase imediatamente (em muito menos de um minuto) após o tratamento mitogênico celular, e, após a ativação, movem-se para o núcleo instantaneamente. Uma vez lá, elas passam a fosforilar e ativar funcionalmente uma série de fatores de transcrição chave.

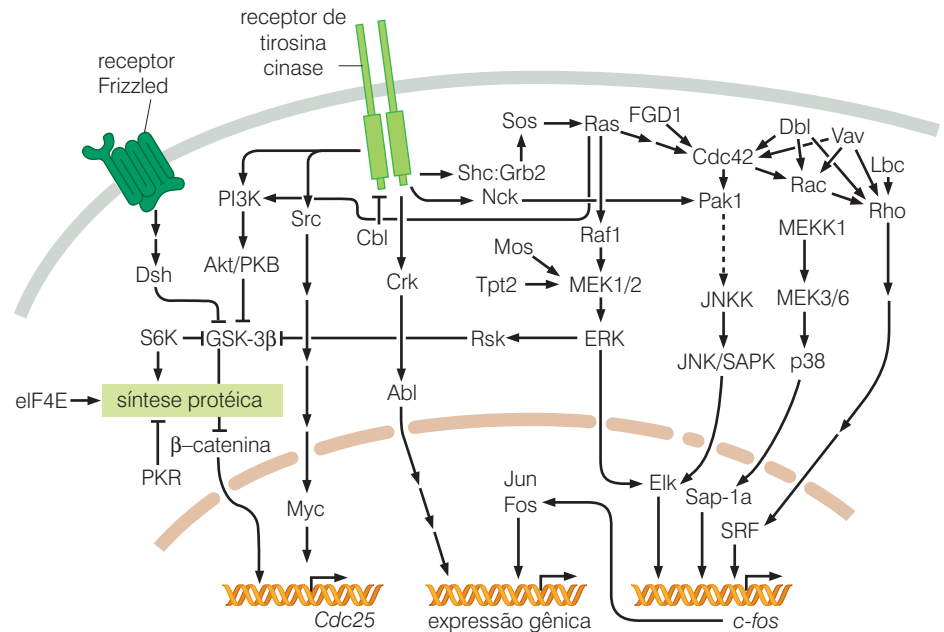
Uma rota de sinalização um pouco mais lenta, mas muito efetiva, deriva da estratégia, anteriormente citada, de ativar fatores de transcrição dormentes no citoplasma e emití-los na forma ativada para o núcleo. Os mecanismos de sinalização mais lentos dependem da modulação da concentração de proteínas sinalizadoras. Esse modo de regulação pode ocorrer por mudanças nas taxas de transcrição de certos genes, tradução e estabilização de seus mRNAs ou estabilização pós-traducional de seus produtos protéicos.

O circuito de sinalização intracelular encontrado neste capítulo parece ser organizado de forma similar em vários tipos celulares pelo corpo. Tal fato tem importantes implicações para a nossa compreensão sobre câncer e seu desenvolvimento. Mais especificamente, sugere que as lições bioquímicas aprendidas a partir do estudo da transformação neoplásica de um tipo celular geralmente provará ser aplicável para uma série de outros tipos celulares pelo corpo. O crescente acúmulo de informações sobre aberrações genéticas de células cancerígenas humanas provê forte suporte para essa noção.

O desenho similar do circuito de regulação de crescimento intracelular em diversos tipos celulares nos força a questionar por que diferentes tipos de células se comportam de forma tão diferente em resposta a vários sinais externos. Muitas das respostas virão, finalmente, da compreensão do espectro de receptores que cada tipo celular apresenta em sua superfície. Em princípio, o conhecimento do tipo celular específico dos receptores de superfície celular e da organização consideravelmente invariável do circuito intracelular deverá nos possibilitar prever os comportamentos de vários tipos celulares após exposição a vários mitógenos e fatores de inibição de crescimento como TGF- β . Similarmente, ao entender o espectro de alelos mutantes que coexistem no genoma de uma célula cancerígena, poderemos ser capazes de prever como tais alelos perturbam o comportamento e como eles conspiram para programar o fenótipo celular neoplásico. Na prática, estamos longe de sermos capazes de fazê-lo por pelo menos oito razões:

1. Neste capítulo, descrevemos apenas superficialmente como esses circuitos operam e têm conscientemente evitado muitos dos detalhes. Mas tais detalhes são importantes. Por exemplo, passos individuais nessas rotas são geralmente controlados por múltiplas proteínas de ação similar, cada qual agindo na transdução de sinal de forma levemente diferente das outras. Exemplos disso são as quatro proteínas Ras estruturalmente distintas, as três formas de Akt/PKB ou Raf e seu parente próximo, B-Raf. Na maioria dos casos, permanecemos ignorantes quanto às diferenças funcionais entre as proteínas superficialmente similares que operam em uma rota e, portanto, têm uma compreensão incompleta de como a rota opera como um todo.
2. Complexas alças de retroalimentação positiva e negativa servem para amplificar ou atenuar os sinais que passam por cada uma dessas rotas. Abordamos essas rotas brevemente. Possivelmente, as alças de retroalimentação descobertas até o presente representam apenas a ponta de um grande *iceberg*. Por exemplo, mais de 100 genes que codificam fosfotirosinas fosfatases (PTP) foram encontrados no genoma humano. As PTPs operam para remover os grupos fosfato ligados pelas 90 tirosinas cinases (TKs) presentes em nossas células. Não conhecemos quase nada sobre como estas enzimas-chave são reguladas e quais são seus vários substratos.
3. Cada componente em um circuito age como um dispositivo de processamento de sinal complexo que é capaz de amplificar, atenuar e/ou integrar os sinais que recebe prove-

Figura 6.32 Mapas de sinalização bidimensionais Ao mesmo tempo que descrevermos rotas de sinalização como cascatas lineares vindas da membrana plasmática para o núcleo, com pontos de ramificação ocasionais, pesquisas recentes revelaram que essas rotas interagem via uma série de conexões cruzadas e pontos de convergência. Este diagrama, uma simplificação por si só, provê algumas pistas dessas conexões cruzadas. Note, por exemplo, que a presença de GSK-3 β , que desempenha um papel central na rota Wnt- β -catenina, também é regulada por proteínas sinalizadoras *downstream* de receptores de tirosina cinase. (Adaptada de T. Hunter, *Cell* 88: 333-346, 1997.)



nientes *upstream* em uma rota antes de passá-los a alvos *downstream*. Não começamos a entender de uma forma quantitativa como esse processamento de sinal por proteínas transdutoras de sinal opera.

4. A habilidade de proteínas em transduzir sinais de uma para outra é afetada por suas concentrações intracelulares, modificações pós-traducionais (como fosforilação) e localização intracelular. Apenas começamos a explorar as profundezas de tal complexidade.
5. A avaliação dos tempos de difusão em células indica que a transdução de sinal eficiente e rápida é de ocorrência mais provável apenas quando proteínas de interação são co-localizadas na célula. Somente informações muito fragmentadas estão disponíveis sobre as localizações intracelulares de muitas dessas proteínas e suas parceiras de interação.
6. Nenhuma dessas rotas intracelulares opera isoladamente. Em vez disso, cada uma é influenciada por conexões cruzadas com outras rotas, algumas das quais também foram mencionadas neste capítulo. A busca por estas conexões cruzadas será amplamente discutida até que as operações de cada rota primária sejam elucidadas. Uma vez que tais conexões cruzadas forem adicionadas aos mapas dessas rotas primárias, os desenhos dos circuitos de transdução de sinal provavelmente irão assemelhar-se a uma estrutura de teia (Figura 6.32, por exemplo) em vez de uma série de rotas paralelas que iniciam na membrana plasmática e estendem-se linearmente até o núcleo.
7. Mesmo se essas conexões cruzadas extensas não existissem, os alvos da sinalização – alterações específicas no fenótipo celular – são resultantes de interações combinatórias entre rotas de sinalização múltiplas e convergentes. Mais uma vez, essa dimensão de complexidade continua a nos deixar perplexos.
8. Nossa percepção de como sinais são transmitidos por uma célula é provavelmente falha. Falamos aqui sobre potentes pulsos de sinalização desacelerando rotas de transdução de sinal e evocando, como alvos, respostas fortes e bem-definidas em uma célula. Na verdade, é provável que cada cascata de sinalização opere em um equilíbrio dinâmico bem-afinado, em que reguladores positivos e negativos contrabalançam continuamente um ao outro. Uma entrada de sinalização (um estímulo mitogênico, por exemplo) pode operar como toque em uma fibra em uma parte de uma teia de aranha, que resulta em pequenas reverberações em sítios distantes pela teia. Aqui,

nem a nossa linguagem nem nossas representações matemáticas de sinalização são suficientes para esclarecer nossa compreensão.

Muitos pesquisadores em câncer gostariam de ser capazes de desenhar um diagrama completo e preciso da célula – o esquema que descreve como essas rotas são interconectadas. Uma medida das dificuldades associadas ao desenho dos nós e conexões desse circuito vem de contagens de censos das várias classes de genes no genoma humano. Segundo uma enumeração, existem 518 genes distintos especificando vários tipos de proteínas cinases; 40% desses genes fazem o *splicing* alternativo de mRNAs que codificam variantes estruturais levemente diferentes das cinases protéicas, levando a mais de 1.000 distintas cinases protéicas que podem estar presentes em células humanas. Dos 518 genes de cinase, 90 codificam tirosina cinases, sendo o resto serina/treonina cinases. Entre as 90 tirosina cinases, 58 funcionam como os domínios de sinalização de receptores de fator de crescimento. Esses números fornecem algumas medidas da complexidade do circuito de sinalização que sustenta a patogênese do câncer, já que muitas dessas cinases estão envolvidas na regulação da proliferação e sobrevivência celular.

Indicações de complexidade adicional têm vindo de estudos mais detalhados da bioquímica de sinalização de Ras. Neste capítulo, enfatizamos as ações de Ras em três importantes rotas efetoras, mais especificamente, Raf, PI3 cinase (PI3K) e uma Ral-GEF (algumas vezes chamada de Ral-GDS); veja as Seções 6.5, 6.6 e 6.7. Entretanto, como as proteínas Ras estão sujeitas a um exame bioquímico mais detalhado, esquemas como aqueles apresentados na Figura 6.33 emergirão.

A biologia estrutural tem se tornando praticamente rotineira para determinar as estruturas detalhadas de moléculas protéicas, incluindo proteínas de transdução de sinal que desempenham tais papéis-chave na patogênese do câncer. Visto que a estrutura determina a função, a elucidação dessas estruturas enriquecerá consideravelmente nossa compreensão de como rotas de transdução de sinal operam. Os catálogos dessas estruturas protéicas ainda estão muito incompletos, mas isso está mudando rapidamente, e, no futuro, a informação estrutural de-

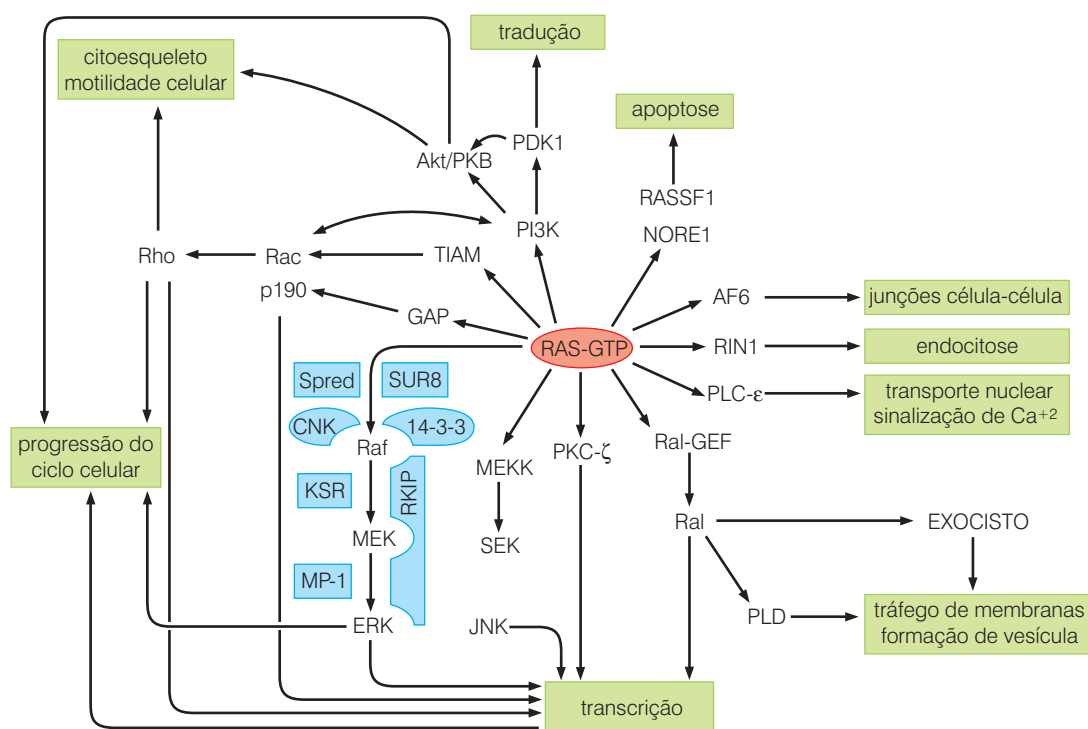


Figura 6.33 Rotas Ras-efetoras Análises bioquímicas detalhadas da forma ativada GTP-ligada das proteínas Ras têm indicado que essas proteínas ligam em muitos mais do que apenas os três principais efetores da sinalização de Ras – Raf, Ral-GEF e PI3 cinase (PI3K). Como está indicado aqui, pelo menos mais oito proteínas de interação com Ras foram descobertas, a maioria provavelmente desempenhando papéis-chave na transmissão de sinais de Ras para circuitos especializados de sinalização *downstream* envolvidos em funções tão diversas quanto transcrição, tráfego de membranas, endocitose e tradução. (Adaptada de M. Malumbres e M. Barbacid, *Nat. Ver. Cancer* 3: 459-465, 2003.)

talhada presente em imagens, como na Figura 6.34, terá grandes impactos em como entendemos as operações de circuitos de sinalização.

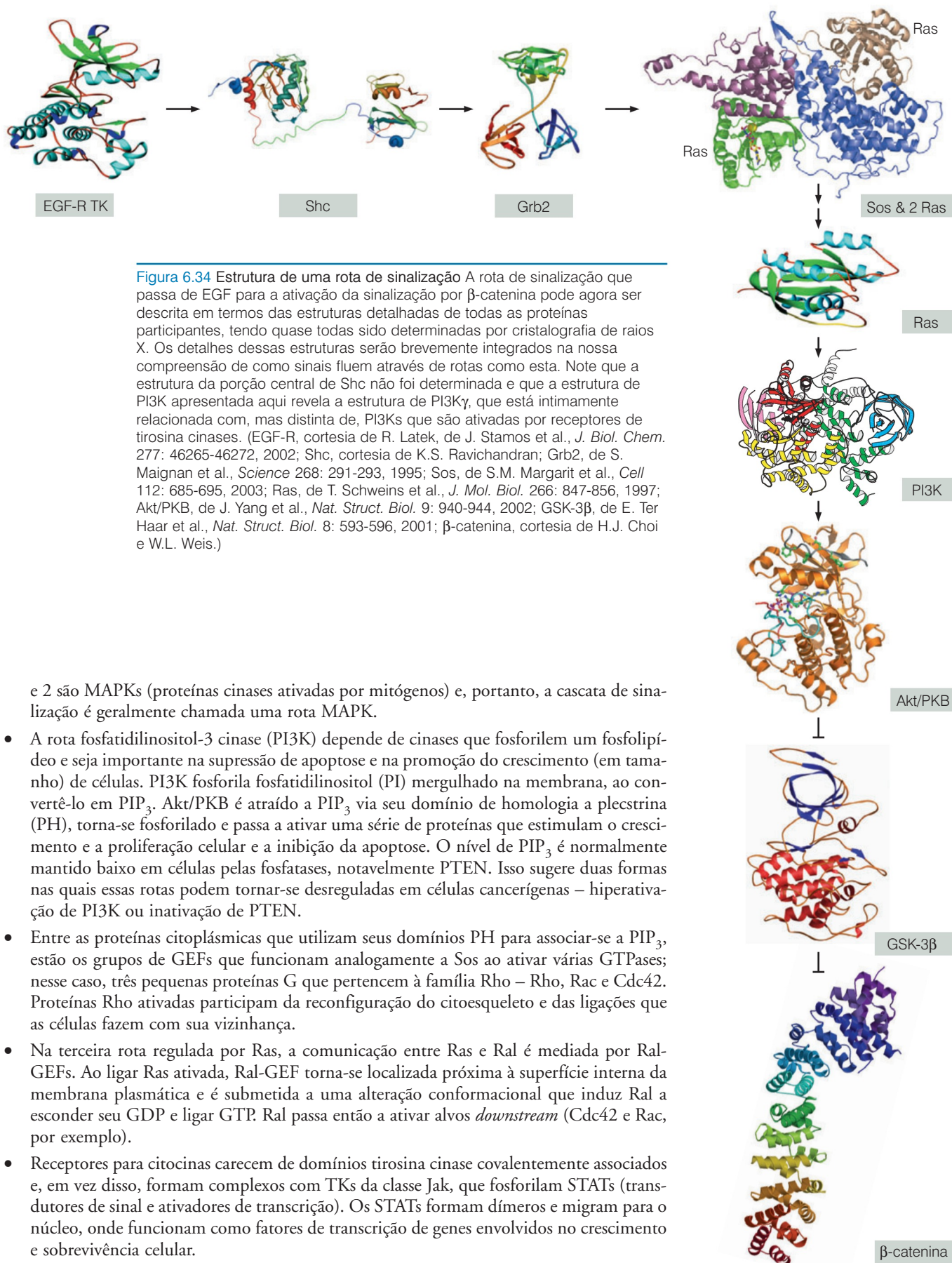
As dificuldades de explicar o comportamento celular em termos do desenho de circuito de transdução de sinal sustenta nossa atual inabilidade em entender outro conjunto de problemas, estes estando relacionados especificamente à genética de genomas de células cancerígenas: por que vários tipos de tumores humanos apresentam tipos altamente específicos de alterações genéticas? Por que 90% dos carcinomas pancreáticos portam um oncogene *K-ras* mutante, enquanto essa mutação é vista em apenas uma pequena proporção (< 10%) dos cânceres mamários? Por que as amplificações do receptor EGF e seu parente, HER2/erb2, são encontradas em mais de um terço dos cânceres mamários humanos, mas incomumente observadas em alguns outros tipos de cânceres epiteliais, ainda que esses receptores estejam bastante apresentados em muitos tipos de epitélios normais?

Por que aproximadamente 50% dos carcinomas de cólon portam um gene mutante *K-ras* e como os 50% remanescentes desses tumores adquirem um sinal mitogênico comparável? Alguns desses outros tumores têm proteínas mutantes B-Raf ou PI3K. Além disso, isso deixa muitos cânceres sem nenhuma alteração aparente afetando a cascata de sinalização Ras → Raf → MAPK ou a rota paralela PI3K → Akt/PKB. Será que tais tumores portam lesões genéticas ainda não reveladas que ativam uma ou outra rota? Ou, alternativamente, será que as células nesses tumores são capazes de proliferar descontroladamente devido a mecanismos que não tem nenhuma relação com as operações dessas rotas em particular? E por que certas combinações de genes mutantes ou alterados são encontrados em células cancerígenas, enquanto outras combinações são raramente (ou nunca) observadas?

Finalmente, há um grande problema na oncologia clínica que permanece longe de ser solucionado: por que certas combinações de alelos mutantes e padrões de expressão proteica em células cancerígenas anunciam um bom ou mau prognóstico para pacientes? Atualmente, estamos consideravelmente limitados a notar correlações entre esses padrões e resultados clínicos. Mas correlações dificilmente revelam as correntes de causalidade conectando os genomas de células cancerígenas com o comportamento dos tumores que tais células criam. É provável que muitos anos se passem antes que esses e outros mistérios relacionados sejam definitivamente solucionados.

Conceitos-chave

- Src possui três domínios de homologia: SH1 porta a função catalítica; SH2 age como um “receptor” intracelular para fosfotirosinas específicas cujas singulares identidades são determinadas pela sequência oligopeptídica particular nas suas extremidades C’; e SH3 reconhece e liga certos domínios ricos em prolina de substratos.
- Como consequência da transfosforilação induzida por ligante, um receptor de tirosina cinase apresenta, na sua cauda citoplásmica, um arranjo de fosfotirosinas. Cada fosfotirosina atrai e liga uma proteína citoplásmica contendo SH2 específica. Tal ligação de proteínas contendo SH2 permite-lhes interagir com proteínas associadas à membrana plasmática e fosfolipídeos, gerando assim uma variedade de sinais bioquímicos que podem ser transmitidos a várias cascatas de sinalização *downstream*.
- Sos afeta Ras como um fator de troca de nucleotídeo de guanina (GEF): ela induz Ras a trocar GDP por GTP, dessa forma ativando-o. Duas proteínas de ligação, Shc e Grb2, formam uma ponte física entre um receptor fosforilado na tirosina e Sos. Isso traz Sos a uma posição para interagir com proteínas Ras, a maioria estando ligada à face interna da membrana plasmática.
- Três das principais cascatas de sinalização *downstream* emanam de Ras ativada via ligação de sua alça efetora com parceiras de sinalização *downstream* – os efetores Ras; estes são a Raf cinase, fosfatidilinositol-3 cinase (PI3K) e Ral-GEF.
- Raf fosforila resíduos em MEK. O MEK ativado resultante fosforila e ativa as cinases extracelulares ativadas por sinal 1 e 2 (Erk1 e 2), que fosforilam outros substratos. Erk 1



- Enquanto receptores de tirosina cinase ligam GFs, integrinas ligam componentes da ECM, que podem levar a formação de adesões focais e ativação de cinase de adesão focal (FAK), um não-receptor de TK associado às caudas citoplásmicas de integrinas. Os resíduos de fosfotirosina resultantes em FAK fornecem um sítio de ancoragem para Src, que fosforilam tirosinas FAK adicionais, provendo sítios de ancoragem para outras moléculas contendo SH2 e ativação de alvos *downstream*, incluindo Ras e PI3K.
- A rota controlada por fatores Wnt permite que as células permaneçam em um estado relativamente indiferenciado – um importante atributo de certas células cancerígenas. Agindo a partir de receptores Frizzled, Wnt suprime a atividade de glicogênio sintase cinase-3 β (GSK-3 β), que, do contrário, fosforilaria uma série de substratos-chave, incluindo β -catenina e ciclina D1, marcando-as para destruição. A β -catenina poupada move-se para o núcleo e ativa a transcrição de genes de estimulação de crescimento chaves ao ligar-se a proteínas Tcf/Lef.
- Ao ligar seus ligantes extracelulares, GPCRs ativam proteínas G heterotrímicas citoplásmicas cujas subunidades α trocam seus GDP por GTP. A subunidade G α dissocia-se então de suas duas parceiras (G β + G γ) e passa a ativar ou inibir uma série de enzimas citoplásmicas (p. ex., Src, adenilato ciclase, fosfolipase C), tendo efeitos mitogênicos ou antimitogênicos, enquanto o dímero G β + G γ ativa seus próprios efetores, incluindo PI3K γ , PLC- β , Src, Rho-GEFs.
- O sistema de sinalização do fator nuclear κ B (NF- κ B) depende da formação de homo e heterodímeros de NF- κ B no citoplasma. O inibidor de NF- κ B (I κ B) geralmente seqüestra NF- κ B no citoplasma, mas, em resposta a sinalização, é marcado para destruição pela I κ B cinase (IKK). Isso deixa NF- κ B livre para migrar para o núcleo, onde ativa a expressão de pelo menos 150 genes, alguns dos quais especificando proteínas antiapoptóticas chave. NF- κ B também funciona na forma mitogênica ao induzir a expressão dos genes *myc* e ciclina D1.
- Ao ligar um de seus ligantes, Notch é clivado duas vezes, liberando um fragmento citoplásmico que migra para o núcleo e funciona como parte de um complexo de fator de transcrição. A quebra do receptor ativado significa que, diferentemente de RTKs, cada Notch pode descarregar apenas uma vez ao ligar uma molécula ligante.
- A ligação do receptor Patched por um ligante Hedgehog faz com que Patched libere a proteína Smoothened da inibição. Smoothened emite então sinais *downstream* que protegem a proteína Gli citoplásmica da clivagem. A Gli intacta pode então migrar para o núcleo, onde funciona como um ativador da transcrição, enquanto Gli clivado produz um fragmento que age como um repressor transcricional.
- A rota de sinalização TGF- β envolve o despachamento de fatores de transcrição Smad citoplásmicos para o núcleo, onde ajudam a ativar um grande contingente de genes. Essa rota desempenha um importante papel na patogênese de muitos carcinomas, tanto nos estágios primários, quando TGF- β age para controlar a proliferação celular, quanto posteriormente, quando contribui para a invasividade celular tumoral.
- As rotas descritas funcionam de uma forma combinada para garantir que a proliferação ocorra no lugar e na hora certa durante o desenvolvimento; diferentes tipos celulares utilizam diferentes combinações de rotas para regular seu crescimento e divisão.
- Em resumo, sinais são transduzidos a partir das várias rotas a partir da (1) modulação da atividade intrínseca de moléculas sinalizadoras por modificações não-covalentes (ligação de GTP por Ras, por exemplo), dimerização do receptor ou modificação covalente (fosforilação de MEK por Raf, por exemplo); (2) modulação da concentração de uma molécula sinalizadora (aumento da concentração e PIP₃ por PI3K e decréscimo por PTEN, por exemplo); (3) regulação da localização intracelular de moléculas sinalizadoras (atração de moléculas contendo SH2 distintas por RTKs fosforiladas; translocação de moléculas citoplásmicas para o núcleo, por exemplo).

Questões elaboradas

1. Que mecanismos moleculares foram desenvolvidos para garantir que os sinais cursando pela cascata de sinalização alcancem o alvo apropriado em vez de serem transmitidos não-especificamente para alvos “não-intencionados” no citoplasma?
2. Quantos mecanismos moleculares distintos você pode citar que levam a conversão de um proto-oncogene em um oncogene ativo?
3. Por que mutações pontuais em oncogenes *ras* são confinadas tão estreitamente a um pequeno número de nucleotídeos, enquanto mutações pontuais em outras proteínas relacionadas ao câncer são geralmente bem mais distribuídas pelas fases de leitura que codificam essas outras proteínas?
4. Que fatores determinam o tempo de vida de um estado ativado de uma oncoproteína Ras?
5. O tratamento de células com proteases que clivam o ectodomínio de E-caderina geralmente resulta em rápidas mudanças na expressão gênica. Como você pode racionalizar essa, dado o que sabemos sobre essa proteína de superfície celular?
6. Que mecanismos encontramos que garantem que um sinal iniciado por um receptor de fator de crescimento pode ser consideravelmente amplificado como o sinal que é transduzido adiante em um cascata de sinalização no citoplasma? De forma contrária, que cascata(s) de sinalização limita(m) fortemente a possível amplificação de um sinal iniciado na superfície celular?
7. Que parâmetros quantitativos que descrevem proteínas transdutoras de sinal individuais precisarão ser determinados antes que o comportamento da cascata de sinalização formado por essas proteínas possa ser previsto a partir de modelagem matemática?

Leitura adicional

- Alonso A, Sasin J, Bottini N et al. (2004) Protein tyrosine phosphatases in the human genome. *Cell* 117, 699–711.
- Artavanis-Tsakonas S, Rand MD & Lake RJ (1999) Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science* 284, 770–776.
- Blume-Jensen P & Hunter T (2001) Oncogenic kinase signalling. *Nature* 411, 355–365.
- Bourne HR, Sanders DA & McCormick F (1990) The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. *Nature* 348, 125–132.
- Bowman T, Garcia J, Turkson J & Jove R (2000) STATs in oncogenesis. *Oncogene* 19, 2474–2488.
- Brazil DP & Hemmings BA (2001) Ten years of protein kinase B signalling: a hard Akt to follow. *Trends Biochem. Sci.* 26, 657–664.
- Buettner R, Mora LB & Jove R (2002) Activated STAT signaling in human tumors provides novel molecular targets for therapeutic intervention. *Clin. Cancer Res.* 8, 945–954.
- Campbell SL, Khosravi-Far R, Rossman KL et al. (1998) increasing complexity of Ras signaling. *Oncogene* 17, 1395–1413.
- Caron E (2003) Rac signaling: a radical view. *Nat. Cell Biol.* 5, 185–187.
- Chang L & Karin M (2001) Mammalian MAP kinase signaling cascades. *Nature* 410, 37–40.
- Cohen P and Frame S (2001) The renaissance of GSK3. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 769–775.
- Dale TC (1998) Signal transduction by the Wnt family of ligands. *Biochem. J.* 329, 209–223.
- Derynck R & Zhang YE (2003) Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- β family signaling. *Nature* 425, 577–584.
- Gilman A. (1987) G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annu. Rev. Biochem.* 56, 615–649.
- Hazzalin CA & Mahadevan LC (2002) MAPK-regulated transcription: a continuously variable switch? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 30–40.
- Hunter T (1995) Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell* 80, 225–236.
- Hunter T (1997) Oncoprotein networks. *Cell* 88, 333–346.
- Hunter T (2000) Signaling—2000 and beyond. *Celi* 100, 113–127.
- Hynes RO (2002) integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 110, 673–687.
- Kadesch T (2004) Notch signaling: the demise of elegant simplicity. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 14, 506–512.
- Karin M, Cao Y, Greten FR & Li Z-W (2002) NF- κ B in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nat. Rev. Cancer* 2, 301–310.
- Levy DE & Darnell JE Jr (2002) STATs: transcriptional control and biological impact. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 651–662.
- Lewis TS, Shapiro PS & Ahn NG (1998) Signal transduction through MAP kinase cascades. In *Advances in Cancer Research* (GE Vande Woude, G Klein eds), pp 49–139. San Diego: Academic Press.
- Lowy DR & Willumsen BM (1993) Function and regulation of Ras. *Annu. Rev. Biochem.* 62, 851–891.
- Malumbres M & Barbacid M (2003) RAS oncogenes: the first thirty years. *Nat. Rev. Cancer* 3, 459–465.
- Manning G, Whyte DB, Martinez R et al. (2002) The protein kinase complement of the human genome. *Science* 298, 1912–1934.
- Marinissen MJ & Gutkind JS (2001) G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms. *Trends Pharmacol. Sci.* 22, 368–376.
- McCormick F (1999) Signalling networks that cause cancer. *Trends Cell Biol.* 9, M53–M56.
- McManus EJ & Alessi DR (2002) Tsc1-Tsc2: a complex tale of PKB-mediated S6K activation. *Nat. Cell Biol.* 4, E214–E216.
- Miele L & Osborne B (1999) Arbiter of differentiation and death: Notch signaling meets apoptosis. *J. Cell Physiol.* 181, 393–409.
- Mumm JS & Kopan R (2000) Notch signaling: from the outside in. *Dev. Biol.* 228, 151–165.
- Nelson WJ & Nusse R (2004) Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. *Science* 303, 1483–1487.
- Neves SR, Ram PT & Iyengar R (2002) G protein pathways. *Science* 296, 1636–1639.

- Pawson T (2004) Specificity in signal transduction: from phosphotyrosine-SH2 domain interactions to complex cellular systems. *Cell* 116, 191–203.
- Pawson T & Nash P (2003) Assembly of cell regulatory systems through protein interaction domains. *Science* 300, 445–452.
- Pawson T & Scott JD (1997) Signaling through scaffold, anchoring and adaptor proteins. *Science* 278, 2075–2079.
- Perkins ND (2004) NF- κ B: tumor promoter or suppressor? *Trends Cell Biol.* 14, 64–69.
- Polakis P (1999) The oncogenic activation of β -catenin. *Curr Opin. Genet. Dev.* 9, 15–21.
- Polakis P (2000) Wnt signaling and cancer. *Genes Dev.* 14, 1837–1851.
- Reuther GW & Der CJ (2000) The Ras branch of small GTPases: Ras family members don't fall far from the tree. *Curr Opin. Cell Biol.* 12, 157–165.
- Richmond A. (2002) NF- κ B, chemokine gene transcription and tumour growth. *Nat. Rev. immunol.* 2, 664–674.
- Scheid MP & Woodgett JR (2001) PKB/Akt: functional insights from genetic models. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 760–767.
- Schlaepfer DD & Hunter T (1998). Integrin signalling and tyrosine phosphorylation: just the FAKs? *Trends Cell Biol.* 8, 151–157.
- Schlessinger J (2000) Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 103, 211–225.
- Seto ES & Bellen HJ (2004) The ins and outs of Wingless signaling. *Trends Cell Biol.* 14, 45–53.
- Shamji AF, Nghiem P & Schreiber SL (2003) Integration of growth factor and nutrient signaling: implications for cancer biology. *Mol. Cell* 12, 271–280.
- Shi Y & Massagué J (2003) Mechanisms of TGF- β signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 113, 685–700.
- Shields JM, Pruitt K, McFall A et al. (2000) Understanding Ras: “it ain't over 'til it's over.” *Trends Cell Biol.* 10, 147–154.
- Smalley MJ & Dale TC (1999) Wnt signalling in mammalian development and cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 18, 215–230.
- Taipale J & Beachy PA (2001) The Hedgehog and Wnt signalling pathways in cancer. *Nature* 411, 349–354.
- Vivanco I & Sawyers CL (2002) The phosphatidylinositol 3-kinase-AKT pathway in human cancer. *Nat. Rev. Cancer* 2, 489–501.
- Vogt PK (2001) PI 3-kinase, mTOR, protein synthesis and cancer. *Trends Mol. Med.* 7, 482–484.
- Weng AP & Aster JC (2004) Multiple niches for Notch in cancer: context is everything. *Curr Opin. Genet. Dev.* 14, 48–54.
- Wicking C & McGlinn E (2001) The role of hedgehog signalling in tumorigenesis. *Cancer Lett.* 173, 1–7.
- Yaffe MB (2002) Phosphotyrosine-binding domains in signal transduction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 177–186.
- Yaffe MB & Elia AEH (2001) Phosphoserine/threonine-binding domains. *Curr Opin. Cell Biol.* 13, 131–138.
- Yarden Y & Sliwkowski MX (2001) Untangling the ErbB signalling network. *Nat. Rev. Cancer* 2, 127–137.
- Yu H & Jove R (2004) The SIAIs of cancer—new molecular targets come of age. *Nat. Rev. Cancer* 4, 97–105.



CAPÍTULO 7

Genes Supressores de Tumor

“Deixe-me adicionar... uma consideração da *herança de tumores*... Para que um tumor possa surgir em tais casos, os elementos homólogos nas duas séries de cromossomos devem ser enfraquecidos do mesmo jeito.”

Theodor Boveri, patologista, 1914

A descoberta de proto-oncogenes e oncogenes proporcionou uma explicação simples e poderosa de como a proliferação de células é dirigida. As proteínas codificadas por proto-oncogenes participam de várias maneiras do recebimento e processamento de sinais estimuladores de crescimento que surgem no ambiente extracelular. Quando esses genes sofrem mutações, o fluxo de sinais promotores de crescimento liberados por essas proteínas torna-se desregulado. Em vez de emití-los em grandes quantidades cuidadosamente controladas, as oncoproteínas liberam uma corrente estacionária de sinais estimuladores de crescimento, resultando na incessante proliferação associada às células cancerosas.

A lógica que embasa sistemas de controle bem-desenhados dita, entretanto, que os componentes que promovem um processo sejam contrabalanceados por outros que se opõem ao processo. Sistemas biológicos parecem também seguir essa lógica, o que nos leva a concluir que os genes promotores de crescimento que discutimos até agora propiciam apenas parte da história do controle de crescimento celular.

Na década de 1970 e começo da de 1980, certas evidências experimentais sobre genética de células cancerosas começaram a se acumular, sendo difícil reconciliá-las com as propriedades conhecidas dos oncogenes. Essas evidências apontaram para a existência de um segundo, fundamentalmente diferente, tipo de gene controlador de crescimento – um que opera para restringir ou suprimir a proliferação celular. Os genes de anticrescimento vieram a ser chamados de **genes supressores de tumor**. Seu envolvimento em formação de tumor pareceu acontecer quando foram desativados ou perdidos. Uma vez que uma célula perde um desses genes, ela torna-se liberada de seus efeitos supressores de tumor. Agora, quase três décadas depois, percebemos que a desativação de genes supres-

sores de tumor desempenha um papel na patogênese do câncer, o qual é tão importante para este quanto a ativação de oncogenes. Na verdade, a perda desses genes do genoma de uma célula pode ser até mais importante do que a ativação de oncogenes para a formação de muitos tipos de células cancerosas humanas.

7.1 Experimentos de fusão celular indicam que o fenótipo cancerígeno é recessivo

O estudo de viroses tumorais na década de 1970 revelou que esses agentes infecciosos carregavam um número de genes indutores de câncer, especialmente oncogenes virais, os quais agiam de forma dominante quando genomas virais eram introduzidos em células previamente normais (veja o Capítulo 3). Em particular, a introdução de um genoma de vírus tumoral em uma célula normal resultaria em uma transformação de tal célula. Essa resposta significava que oncogenes virais poderiam ditar comportamento celular apesar da presença e expressão continuada de genes celulares opostos na célula infectada, os quais geralmente funcionavam para assegurar a proliferação celular normal. Como os oncogenes virais podiam sobrepujar os genes celulares, por definição os genes virais eram capazes de induzir um fenótipo *dominante* – eles estavam mediando uma transformação celular. Isso sugeria, por extensão, que o crescimento de células cancerosas era um fenótipo dominante em contraste com o crescimento celular normal (tipo selvagem), o qual foi portanto considerado *recessivo* (veja a Seção 1.1).

Além disso, esses estudos de transformação celular induzida por vírus tumorais falharam na modelagem precisa de mecanismos genéticos que pareciam ser responsáveis pela formação da maioria dos tumores humanos. Como suspeitado àquela época, e reforçado por pesquisas na década de 1980, muitos cânceres humanos pareciam não surgir como consequência de infecções por vírus tumorais. Para muitos, isso deixou sem resposta a questão fundamental da genética de cânceres humanos. Assim, se cânceres humanos não eram causados por vírus tumorais, então as lições ensinadas pelo estudo destes poderiam ser também irrelevantes para entender como surgiam os tumores humanos. Nesse caso, seria necessário livrar-se de todos os conceitos prévios de como um tumor começa e admitir a possibilidade de que o fenótipo cancerígeno era, com igual probabilidade, uma característica dominante ou recessiva.

Uma pista inicial da importância de alelos recessivos indutores de tumor veio de experimentos realizados na Universidade de Oxford, Grã-Bretanha. Comparações significativas de dois alelos alternativos e fenótipos especificados podem ocorrer somente quando ambos os alelos são forçados a coexistir dentro da mesma célula ou organismo. Na genética mendeliana, quando o alelo de um gene que especifica um fenótipo dominante é justaposto a outro alelo que especifica um fenótipo recessivo, o alelo dominante, por definição, prevalece – a célula responde expressando o fenótipo do alelo dominante (Seção 1.1)

A técnica de fusão celular foi bastante adequada para forçar o confronto entre os alelos especificando crescimento normal e aqueles direcionando proliferação maligna. Nesse procedimento, células de dois diferentes fenótipos (e frequentemente de diferentes genótipos) são cultivadas juntas em uma placa de Petri (Figura 7.1). Um agente é então usado para induzir fusão das membranas plasmáticas das células que estiverem crescendo próximas umas às outras na monocamada celular. O agente fusionante pode ser um composto químico, como polietileno glicol, ou uma glicoproteína viral, como aquelas presentes na superfície de certos paramixovírus, como o vírus Sendai. Se apenas duas células estão próximas uma à outra, e suas membranas plasmáticas estão em contato, o resultado do tratamento com um agente fusionante será uma célula grande com um único citoplasma e dois núcleos, geralmente denominado um **sincício** (Figura 7.2). Se muitas células estiverem próximas umas às outras na monocamada de células sendo tratada, todas as suas membranas plasmáticas se tornarão fusionadas para criar um sincício único – uma célula mononucleada gigante (um **polícáion**) com um citoplasma extremamente grande.

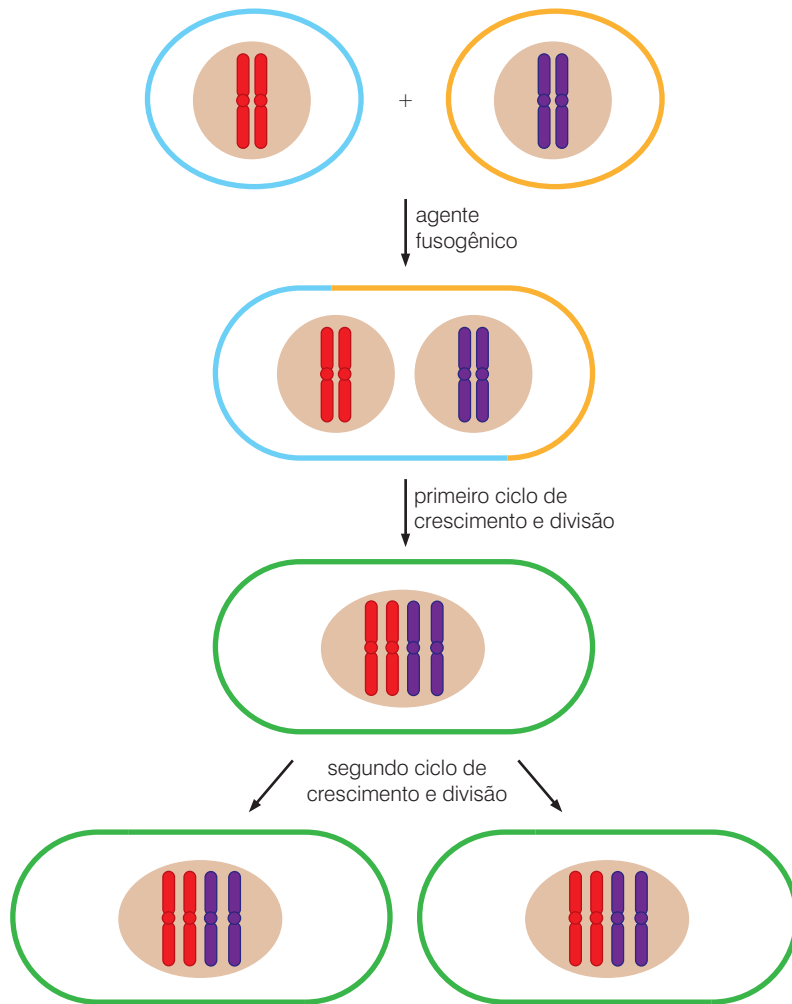
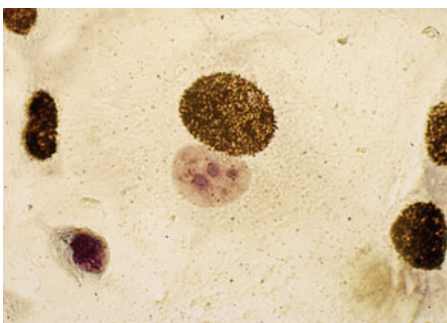


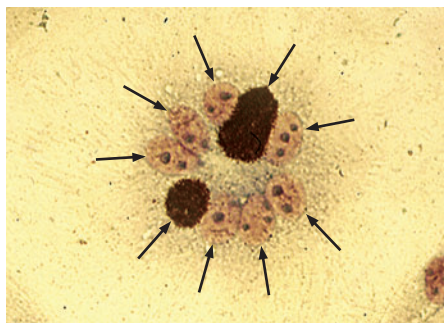
Figura 7.1 Fusão experimental de células Quando células crescendo adjacentes umas às outras em culturas de monocamadas são expostas a um agente fusogênico, como vírus Sendai inativo ou polietileno glicol (PEG), elas inicialmente formam um heterocácion com múltiplos núcleos; a formação de tal célula com dois núcleos é mostrada aqui. Quando esta célula subsequente passa por mitose, os dois conjuntos de cromossomos parentais são reunidos em um núcleo único. Durante a propagação das células tetraplóides resultantes em cultura, as células descendentes com frequência perdem alguns de seus cromossomos, reduzindo assim seu complemento cromossômico a um estado quase triploide ou hiperdiplóide (*não-mostrado*).

Esses agentes fusionantes agrupam células indiscriminadamente, de modo que duas células idênticas podem ser fusionadas uma à outra ou dois tipos diferentes de células podem tornar-se fusionados. Se as duas células participantes dessa união forem de diferentes origens, então a célula híbrida resultante é chamada **heterocácion**, para refletir o fato de que ela carrega dois núcleos geneticamente distintos. Abordagens genéticas podem ser então usadas para selecionar uma célula fusionada que adquiriu dois núcleos geneticamente distintos e, ao mesmo tempo, eliminar células que falharam na fusão ou carregam dois núcleos idênticos. Por exemplo, cada tipo de célula pode carregar um marcador genético que permita que ela resista a um agente antibiótico particular ao qual seria normalmente sensível. Em tal exemplo, após as duas populações de células serem misturadas e sujeitas à fusão, apenas heterocácions sobreviverão quando a cultura for exposta aos dois antibióticos.

Figura 7.2 Aparência de células fusionadas experimentalmente Produtos iniciais típicos de células cultivadas fusionadas utilizando-se um agente fusogênico (Figura 7.1; vírus Sendai inativo, neste caso) são vistos aqui. O uso de meios de seleção e marcadores genéticos selecionáveis podem assegurar a sobrevivência de uma célula bi ou multinucleada carregando núcleos derivados de dois tipos distintos de células parentais. O uso desses marcadores genéticos garante a eliminação de células fusionadas cujos núcleos derivam de somente um ou outro tipo de célula parental. Se uma célula híbrida é viável, os complementos dos cromossomos são misturados em um único núcleo durante a mitose subsequente. (A) Nesta imagem, células NIH 3T3 isotopicamente marcadas de camundongo foram fusionadas com células de rim de macaco, resultando em uma célula com dois núcleos distintos. O núcleo do camundongo (maior) é identificado pelos grãos prateados que foram formados durante uma subsequente auto-radiografia. (B) Policácions podem se formar com igual ou maior frequência seguindo tais fusões, mas são geralmente incapazes de proliferar e gerar progênie. Este policácion contém nove núcleos (setas). (Cortesia de S. Rozenblatt.)

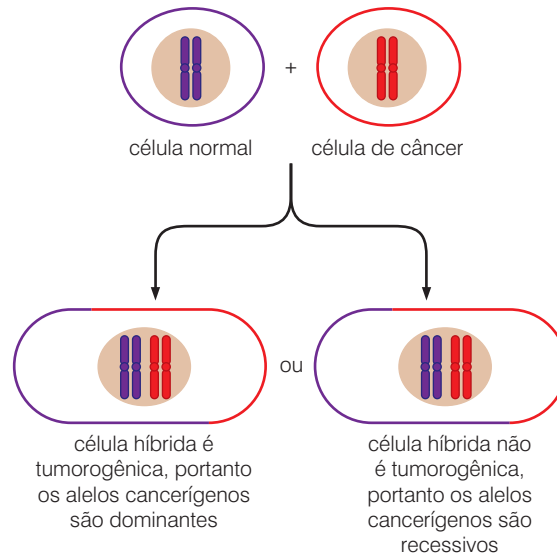


(A)



(B)

Figura 7.3 Dominância e recessividade do fenótipo tumorigênico. O uso de fusão celular para testar a dominância ou recessividade do fenótipo da célula cancerosa pode, em teoria, gerar duas diferentes consequências – células híbridas tumorigênicas ou não-tumorigênicas. De fato, quando células de câncer derivam da maioria dos tipos de tumores humanos não-induzidos por vírus (ou de tumores de roedores induzidos quimicamente) foram usadas nestas fusões, as células híbridas foram não-tumorigênicas. Em contraste, quando as células de câncer derivaram de tumor induzido por vírus, as híbridas foram geralmente tumorigênicas.



Enquanto células com grande número de núcleos são geralmente inviáveis, aquelas com apenas dois núcleos são frequentemente viáveis e crescerão. Quando elas entrarem subsequentemente em mitose, as duas membranas nucleares se partirão, os dois conjuntos de cromossomos se reunirão em um aparato mitótico comum único e cada célula-filha resultante receberá um núcleo único com complementos cromossômicos originários de ambos os tipos de células-mãe. Podemos imaginar a construção de um heterocácion formado pela fusão de uma célula cancerígena com uma célula tipo selvagem. Na célula resultante, os genes mutantes causadores de câncer de uma célula-mãe confrontam diretamente os alelos tipo selvagem (governando a proliferação celular normal) da outra mãe, já que ambos os grupos de genes coexistem no mesmo genoma (Figura 7.3).

Algumas combinações de células híbridas formam genomas que são inicialmente tetraplóides, tendo recebido um genoma diplóide completo de cada célula-mãe. Com frequência, durante a propagação subsequente de tais células em cultura, elas irão progressivamente perder cromossomos e se aproximar de forma gradual de um complemento cromossômico sub-tetraplóide ou até mesmo triploide, uma vez que essas linhagens de células híbridas começam suas vidas com bem mais cromossomos do que realmente precisam para crescer e sobreviver. Às vezes, os cromossomos de uma célula-mãe são preferencialmente perdidos. Por exemplo, quando células humanas e de camundongo são fusionadas, as células híbridas descendentes perdem cromossomos humanos progressivamente até que uma pequena minoria de cromossomos seja de origem humana.

Usando a técnica de fusão celular, células híbridas de diversas origens, incluindo até híbridos humano-galinha, podem ser feitas. Células da fase G_1 do ciclo celular foram fusionadas com células em fase M para ver qual fase do ciclo celular continha os controles dominantes. Células não-diferenciadas foram fundidas com células mais diferenciadas para determinar qual fenótipo dominava. Para nós, entretanto, os resultados de apenas um tipo de experimento são de interesse especial: como cresceram células híbridas normais + tumorigênicas?

As apostas àquela época eram de que um fenótipo potente e dominador como o câncer seria dominante quando oposto ao fenótipo da célula de crescimento normal (veja a Figura 7.3). Nesse exemplo, aquelas apostas estavam erradas. Em vários experimentos, quando células de tumor foram fusionadas com células normais, as células tetraplóides ou subtetraplóides resultantes perderam a habilidade de formar tumores quando injetadas em hospedeiros animais apropriados. Isso significou, bastante inesperadamente, que o fenótipo celular maligno era recessivo ao fenótipo tipo selvagem de crescimento normal.

A notável exceção a tais observações surgiu quando as células-mãe cancerígenas foram previamente transformadas por vírus de tumor. Nessas ocasiões, o fenótipo tumoral (criado pelos oncogenes virais adquiridos) dominou nas células híbridas. Assim, a conclusão sobre fenótipos normais *versus* cancerosos foi sutilmente modificada e estreitada: se a célula cancerígena originalmente surgisse sem o envolvimento de um vírus tumoral, então seu fenótipo maligno seria recessivo quando ela fosse fusionada com a célula normal.

7.2 A natureza recessiva do fenótipo da célula cancerígena requer uma explicação genética

De fato, um modelo genético simples poderia ser evocado para explicar essas observações. Isso dependia da observação, feita muitas vezes em genética, de que o fenótipo de um alelo mutante inativo é recessivo na presença de um alelo tipo selvagem intacto.

Foi feita a seguinte hipótese. Imagine que células normais carreguem genes que restrinjam ou suprimam sua proliferação. Durante o desenvolvimento de um tumor, as células de câncer evoluindo perdem ou desativam um ou mais desses genes. Uma vez que eles são perdidos, a proliferação das células cancerígenas acelera, não mais sendo freada pela ação deles. Enquanto as células cancerígenas estiverem sem tais genes, elas continuarão a proliferar-se de maneira maligna. No entanto, no momento em que versões tipo selvagem intactas desses genes novamente operam na célula cancerígena, após serem introduzidas pela técnica de fusão celular, a proliferação da célula, ou pelo menos sua habilidade de formar tumores, cessa abruptamente.

Visto que as versões tipo selvagem desses genes hipotéticos são antagônicas ao fenótipo cancerígeno, tais genes foram chamados de genes supressores de tumor (TSGs). Houve argumentos a favor e contra a existência de genes supressores de tumor. A seu favor estava o fato de que é muito mais fácil desativar um gene por uma variedade de mecanismos mutacionais do que hiperativar seu funcionamento por meio de uma mutação. Por exemplo, um proto-oncogene *ras* pode ser (hiper)ativado apenas por uma mutação pontual que afeta seus códons 12, 13 ou 61 (Seção 5.9). Em contraste, um gene supressor de tumor, ou qualquer outro gene, pode ser prontamente desativado por mutações pontuais em muitos sítios nas suas seqüências codificadoras de proteína ou por deleções aleatórias que extraíam blocos de nucleotídeos dessas seqüências.

O caso lógico contra a existência de genes supressores de tumor derivou do estado diplóide do genoma de células de mamíferos. Se alelos mutantes inativos de genes supressores de tumor realmente desempenhassem um papel no crescimento de células cancerígenas, e se esses alelos fossem recessivos, uma célula tumoral não se beneficiaria da inativação de somente uma de suas duas cópias de um gene supressor de tumor, já que o alelo mutante recessivo coexistiria com um alelo tipo selvagem dominante em tal célula. Logo, parecia que ambas as cópias tipo selvagem de um dado gene supressor de tumor precisariam ser eliminadas por uma célula cancerígena aspirante antes de ela verdadeiramente beneficiar-se da inativação.

Esse requerimento para duas alterações genéticas separadas parecia complexo e improvável demais para ocorrer em um razoavelmente curto período. Uma vez que a probabilidade de ocorrência de duas mutações é o quadrado da probabilidade de ocorrência de uma única, parecia altamente improvável que genes supressores de tumor pudessem ser totalmente desativados durante o tempo necessário para a formação de tumores. Por exemplo, se a probabilidade de desativar uma única cópia de um gene por mutação está na ordem de 10^{-6} por geração celular, a probabilidade de silenciar ambas as cópias está na ordem de 10^{-12} por geração – excessivamente improvável, dado o pequeno tamanho de populações de células cancerígenas incipientes, as múltiplas alterações genéticas necessárias para formar um tumor humano e o longo tempo durante o qual células multiplamente mutadas expandem-se em tumores clinicamente detectáveis.

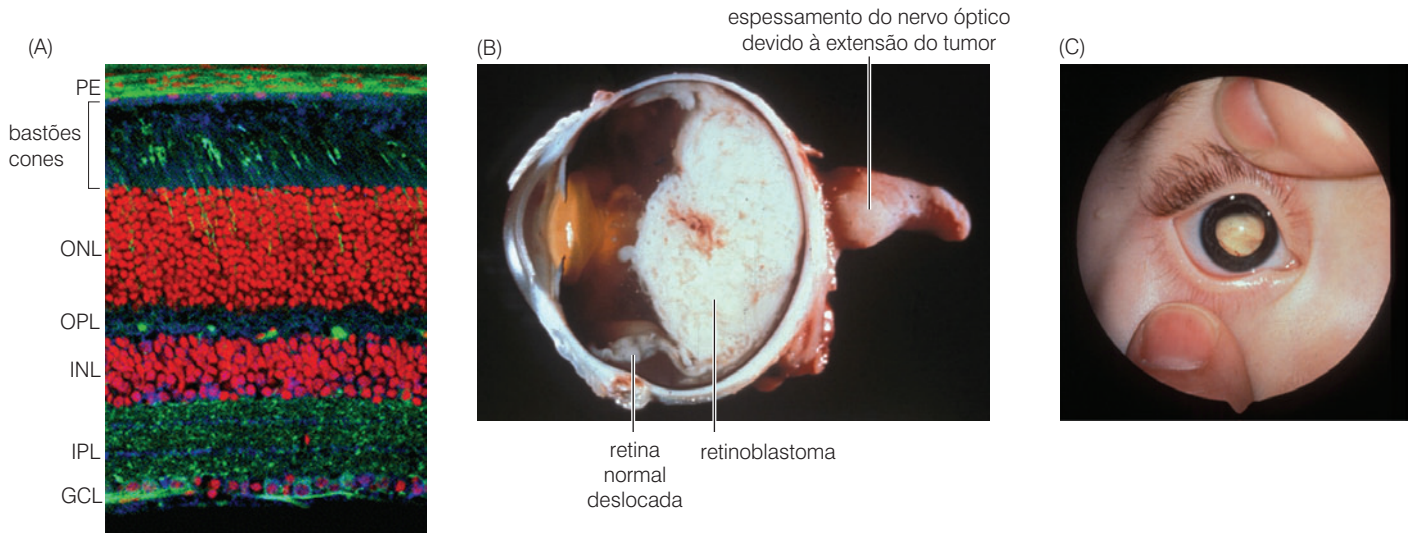


Figura 7.4 Retinoblastomas pediátricos Por razões desconhecidas, defeitos no gene *Rb* levam preferencialmente à formação de tumores pediátricos na retina, um tecido pequeno altamente especializado, embora o gene *Rb* seja ativo em governar proliferação celular em muitos tipos de células no corpo. (A) Os tumores surgem de uma célula-tronco oligopotencial precursora de múltiplos tipos de células da retina, incluindo bastões e cones. Essa célula-tronco pode ser precursora de todas as células vistas aqui ou apenas de um subconjunto delas. Esta micrografia revela uma secção cruzada da retina mostrando, a partir da parte posterior do globo até a parte anterior do olho (*de cima para baixo*), epitélio pigmentado (PE), camada nuclear externa (ONL), camada nuclear interna (INL), camada plexiforme interna (IPL) e camada celular gangliônica (GCL). (Os núcleos dos bastões e cones estão localizados na ONL, com os fotorreceptores [verde-escuro] estendendo-se para cima na direção do PE.) (B) Uma secção do globo ocular na qual um grande retinoblastoma desenvolveu-se. (C) Um retinoblastoma pode apresentar-se inicialmente na clínica como algo opaco que obscurece a retina. (A, de S.W. Wang et al., *Development* 129:467-477, 2002; B, C, cortesia de T.P. Dryja.)

7.3 O tumor retinoblastoma fornece uma solução para o “quebra-cabeça” genético dos genes supressores de tumor

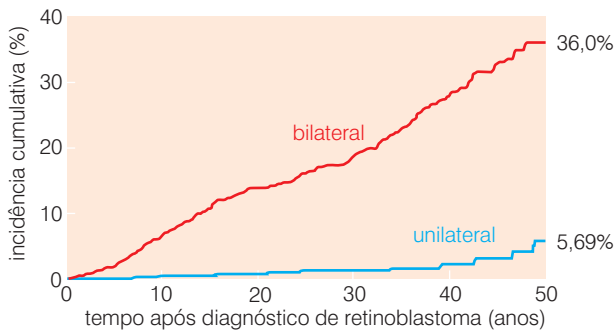
Os argumentos pró e contra o envolvimento de genes supressores de tumor em desenvolvimento tumoral nunca poderiam ser resolvidos pela técnica de fusão celular. Essa estratégia experimental, sozinha, oferecia pouca perspectiva de encontrar e isolar genes específicos cujas propriedades pudessem ser estudadas e usadas para apoiar a hipótese dos genes supressores de tumor. No fim, as informações importantes vieram do estudo de um raro tumor ocular infantil, o **retinoblastoma**.

Esse tumor da retina, originando-se nos precursores de células fotorreceptoras, é normalmente observado em cerca de uma em 20 mil crianças (Figura 7.4). Ele é diagnosticado a qualquer momento a partir do nascimento até a idade de 6 a 8 anos, após o que a doença é raramente encontrada. A **síndrome** do tumor (i. e., um grupo de características clínicas) aparece de duas formas. Algumas crianças – aquelas que nascem em famílias sem histórico de retinoblastoma – apresentam um tumor único em um ou no outro olho. Se esse tumor é eliminado, ou por radiação ou por remoção do olho afetado, a criança não corre mais risco de retinoblastoma e de tumores em outras partes do corpo. Como esse tumor ataca crianças sem histórico familiar, ele é considerado uma manifestação da forma **esporádica** da doença. (Uma vez que esta forma afeta somente um olho, ela é chamada de retinoblastoma *unilateral*.)

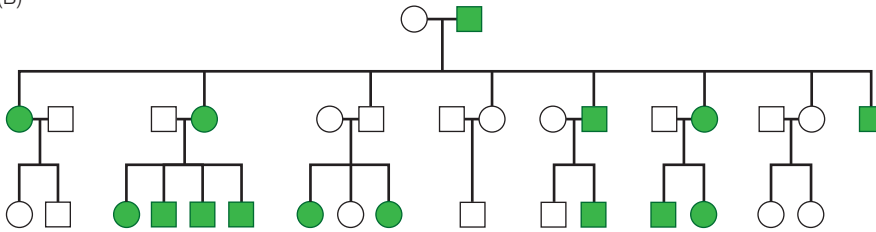
A forma **familiar** de retinoblastoma aparece em crianças que possuem pai ou mãe que também tinha a doença e se curou. Nesse caso, há geralmente múltiplos focos de tumor nos dois olhos (sendo, portanto, chamado de retinoblastoma *bilateral*). Além disso, a cura dos tumores oculares, a qual pode ser realizada por radiação ou cirurgia, não protege essas crianças de um risco extremamente aumentado (mais de 500 vezes acima do normal) de cânceres ósseos (osteossarcomas) durante a adolescência e de uma suscetibilidade elevada a desenvolver ainda outros tumores posteriormente (Figura 7.5A). Aqueles que sobrevivem a esses tumores e tornam-se adultos são geralmente capazes de se reproduzir; na metade de sua prole, a forma familiar de retinoblastoma novamente aparece (Figura 7.5B).

Essa forma familiar de retinoblastoma é passada de uma geração para a próxima de forma semelhante ao comportamento de um alelo mendeliano dominante. Na verdade, uma forma de retinoblastoma indistinguível da doença familiar pode ser vista em crianças sem histórico na família. Nessas crianças, parece que mutações ocorrem *de novo* durante a formação de um espermatozóide ou um óvulo, fazendo com que a criança adquira a mutação causadora do câncer em todas as suas células. Isso cria uma situação genética

(A) tumores não-retinais de pacientes de retinoblastoma



(B)



que é idêntica àquela que ocorre quando o alelo mutante já está presente no genoma do pai ou da mãe e é transmitido via espermatozóide ou óvulo para a prole. (A grande maioria dessas mutações *de novo* são de origem paterna, aparentemente porque muito mais ciclos de divisão celular precedem a formação de um espermatozóide do que a formação de um óvulo; cada ciclo de crescimento e divisão celular apresenta um risco de erros na replicação de DNA que resultam em mutações.)

Pelo estudo da cinética com a qual tumores retinais apareciam em crianças afetadas pela versão familiar ou pela esporádica da doença, Alfred Knudson concluiu, em 1971, que a taxa de aparecimento de tumores familiares era consistente com um evento aleatório único, enquanto os tumores esporádicos comportavam-se como se dois eventos aleatórios fossem necessários para sua formação (Figura 7.6).

Essas cinéticas levaram a uma dedução – na verdade, uma especulação. Digamos que haja um gene chamado *Rb*, cuja mutação esteja envolvida na causa de retinoblastomas infantis. Podemos também imaginar que as mutações que envolvem o gene *Rb* em desenvolvimento de tumor invariavelmente criam alelos inativos e recessivos deste gene. Se os alelos de *Rb* que predis põem ao tumor são mesmo recessivos, então ambas as cópias do gene *Rb* devem ser nocauteadas antes que uma célula da retina inicie a proliferação descontrolada que acaba resultando em um tumor de retina (Figura 7.7).

Em crianças que herdaram uma constituição genética tipo selvagem de seus pais, a formação de um retinoblastoma requererá duas alterações genéticas sucessivas em uma linhagem de células retinais para desativar as duas cópias previamente funcionais do gene *Rb* – isto é, duas mutações somáticas (veja a Figura 7.7). Essas dinâmicas serão bem diferentes em metade das crianças nascidas em uma família na qual retinoblastoma familiar está presente. Em tais crianças, podemos imaginar que uma das duas mutações requeridas no gene *Rb* foi passada pela linhagem germinativa de um dos pais para o ovo fertilizado. Esse gene *Rb* mutante é, portanto, implantado em todas as células do embrião em desenvolvimento, incluindo todas as células da retina. Qualquer dessas células retinais precisa sofrer apenas uma mutação (somática) que nocauteie o alelo tipo selvagem para alcançar o estado em que ela não mais porte uma cópia funcional do gene *Rb*. Tendo atingido tal estado, essa célula pode então ir adiante na criação de um retinoblastoma.

Figura 7.5 Retinoblastoma unilateral versus bilateral (A) Crianças com retinoblastoma unilateral e sem um pai afetado são consideradas como tendo a forma esporádica da doença, enquanto aquelas com retinoblastoma bilateral sofrem de uma forma familiar. Neste gráfico, os cursos clínicos de um grupo de 1.601 pacientes de retinoblastoma que foram diagnosticados entre 1914 e 1984 foram seguidos. Como mostrado, aqueles curados de tumores bilaterais (*linha vermelha*) têm um risco maior de desenvolver outros tumores em uma variedade de órgãos do que têm aqueles com tumores unilaterais (*linha azul*). (Uma porção desse elevado risco é atribuível a tumores que surgiram nas regiões próximas aos olhos devido à radioterapia [i. e., tratamento por irradiação de raios X] usada para eliminar o retinoblastoma quando esses indivíduos eram jovens.) (B) Esta genealogia mostra gerações múltiplas de uma família afetada com retinoblastoma familiar, uma doença que geralmente atinge apenas 1 em 20 mil crianças. Tais genealogias de gerações múltiplas foram raramente observadas antes do advento da medicina moderna, a qual permitiu que uma criança afetada fosse curada da doença e, portanto, atingisse a idade reprodutiva. Machos (*quadrados*), fêmeas (*círculos*), indivíduos afetados (*círculos ou quadrados verdes*), indivíduos não afetados (*círculos ou quadrados brancos*). (A, de R.A. Kleinerman, M.A. Tucker, R.E. Tarone *et al.*, *J. Clin. Oncol.* 23:2272-229, 2005; B, cortesia de T.P. Dryja.)

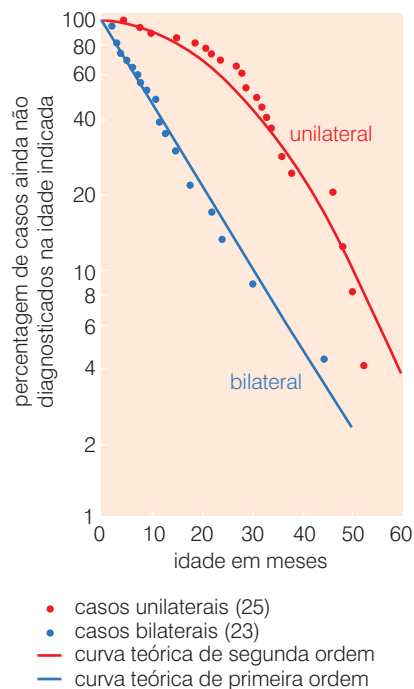


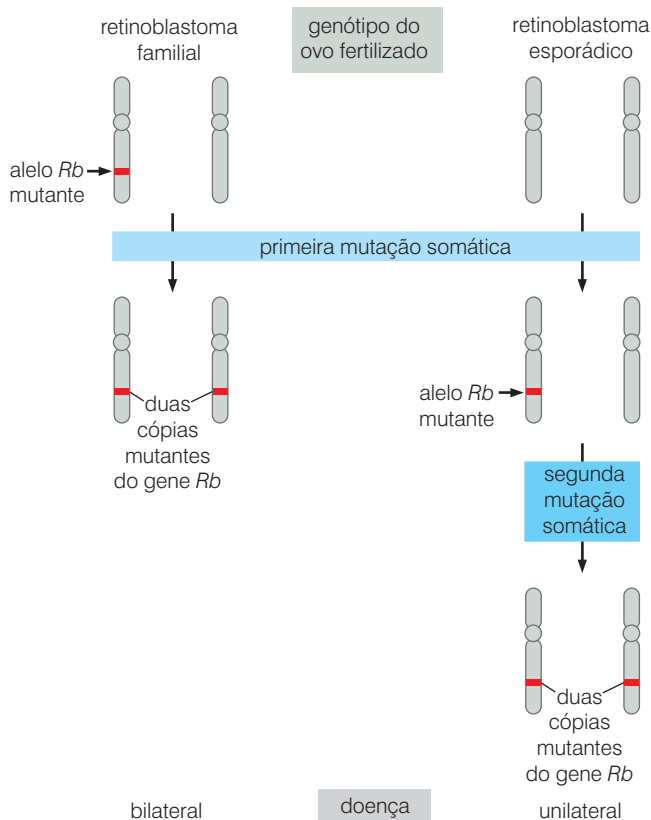
Figura 7.6 Cinética de aparecimento de retinoblastomas unilaterais e bilaterais Alfred Knudson Jr. estudou a cinética com a qual retinoblastomas unilaterais e bilaterais apareciam em crianças. Ele calculou que os casos bilaterais (tumores nos dois olhos) surgiam com uma cinética de primeira ordem, enquanto os tumores unilaterais (afetando apenas um dos olhos) surgiam com uma cinética de segunda ordem. Achava-se que cada ordem representasse uma mutação somática. O fato de que a cinética de segunda ordem envolvia duas cópias do gene *Rb* foi notado somente mais tarde. Percentagem de casos ainda não-diagnosticados (ordenada) na idade (em meses) indicada (abscissa). (De A.G. Knudson Jr. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 68:820-823, 1971.)

Essa proposição do comportamento do gene *Rb* corresponde exatamente aos atributos de genes supressores de tumor cuja existência foi postulada a partir de resultados de estudos de fusão celular (veja também a Barra lateral 7.1). Ainda assim, tudo isso permaneceu apenas uma hipótese atrativa, visto que o gene *Rb* não havia sido clonado e nenhuma evidência molecular estava disponível mostrando cópias do gene *Rb* tornadas inativas por mutação.

7.4 Células de câncer incipientes inventam modos de eliminar cópias tipo selvagem de genes supressores de tumor

Os resultados com o gene *Rb* reforçaram a noção de que ambas as cópias deste gene precisavam ser eliminadas, levantando novamente um ponto preocupante: como poderiam as duas cópias de um gene supressor de tumor ser eliminadas, uma após a outra, durante a formação do retinoblastoma esporádico, se a probabilidade de ocorrência de ambos os eventos de mutação necessários é, como calculada anteriormente, de cerca de 10^{-12} por geração celular? Devido às relativamente pequenas populações de células nas retinas em desenvolvimento (Knudson acreditava em cerca de 10^6 células), parecia mui-

Figura 7.7 Dinâmica de formação de retinoblastoma Os dois genes afetados preditos por Knudson (veja a Figura 7.6) são as duas cópias do gene *Rb* no cromossomo 13 humano. Em retinoblastoma familiar, o zigoto (ovo fertilizado) do qual a criança deriva carrega uma cópia defeituosa do gene *Rb*, e todas as células de retina nessa criança carregarão, portanto, uma única cópia funcional do gene *Rb*. Se essa cópia do gene *Rb* for eliminada de uma célula de retina por uma mutação somática, tal célula perderá toda a função do gene *Rb* e será preparada para proliferar em uma massa de células tumorais. Em retinoblastoma esporádico, o zigoto é geneticamente tipo selvagem no loco *Rb*. Nas retinas da criança resultante, o desenvolvimento de retinoblastoma requererá duas mutações somáticas sucessivas desativando as duas cópias do gene *Rb* carregado por uma linhagem de células retiniais precursoras, gerando mais uma vez a mesma consequência – uma célula preparada para proliferar em uma massa de tumor. Como apenas uma mutação somática é necessária para eliminar a função de *Rb* em casos familiares, múltiplas células em ambos os olhos são afetadas. Entretanto, as duas mutações somáticas requeridas na doença esporádica dificilmente afetam uma única linhagem celular, gerando um tumor, no máximo.



Barra lateral 7.1 Genes *Rb* mutantes são recessivos e dominantes Enquanto a evidência molecular concernente à genética de *Rb* não havia ainda sido apresentada neste capítulo, nossa discussão até esse ponto já continha uma aparente contradição interna. Ao nível do organismo inteiro, um indivíduo que herda um alelo *Rb* mutante defeutivo está quase certamente fadado a desenvolver retinoblastoma em algum ponto da infância. Assim, o alelo *Rb* causador da doença age dominantemente ao nível do organismo inteiro. Não obstante, se fôssemos capazes de estudar o comportamento do alelo

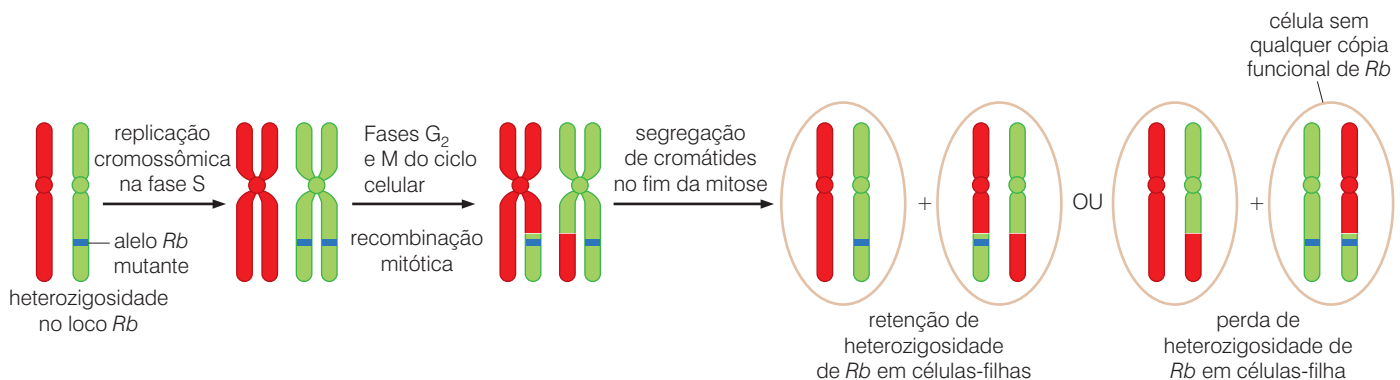
mutante dentro de uma célula desse indivíduo, concluiríamos que o alelo mutante age recessivamente, visto que uma célula carregando uma cópia mutante e uma tipo selvagem do gene *Rb* se comportaria normalmente. Portanto, o alelo *Rb* mutante age dominantemente ao nível do *organismo* e recessivamente ao nível *celular*. (Um geneticista insistente no uso estritamente correto dos termos genéticos diria que o *fenótipo* do retinoblastoma comporta-se dominantemente ao nível do organismo e recessivamente ao nível celular; aqui ignoraremos essa correção.)

to improvável que ambas as cópias pudessem ser eliminadas por meio de dois eventos mutacionais sucessivos.

Uma solução para esse dilema foi sugerida por alguns geneticistas. Suponha que a primeira das duas cópias do gene *Rb* foi mesmo desativada por algum tipo de evento mutacional que ocorreu com uma frequência comparável àquela associada à maioria dos eventos mutacionais – cerca de 10^{-6} por geração celular. Uma célula sofrendo essa mutação iria agora estar em uma configuração heterozigótica, tendo uma cópia do gene tipo selvagem e uma defeituosa – isto é, $Rb^{+/-}$. Como o alelo *Rb* mutante era recessivo ao nível celular, essa célula heterozigótica continuaria a exibir um fenótipo tipo selvagem. Mas, e se a segunda cópia ainda intacta do gene *Rb* fosse desativada por um mecanismo que não dependesse diretamente de um segundo evento mutacional independente? Em vez disso, talvez houvesse alguma troca de informação genética entre cromossomos homólogos pareados, um carregando uma cópia tipo selvagem e outro uma cópia já mutante do alelo de *Rb*. Normalmente, se pensaria que a recombinação entre cromossomos ocorria quase exclusivamente durante a meiose. O que aconteceria se, em vez disso, uma recombinação ocorresse entre um dos braços da cromátide carregando o alelo *Rb* tipo selvagem e a cromátide do cromossomo pareado carregando o alelo mutante (Figura 7.8)? Pensava-se que tal recombinação ocorria durante a proliferação celular ativa; conseqüentemente, ela foi denominada **recombinação mitótica**, para ser distinguida dos eventos de recombinação meiótica que misturam braços cromossômicos previamente à formação do espermatozoide e do óvulo.

Assim, o braço cromossômico carregando o alelo *Rb* tipo selvagem pode ser substituído por um braço cromossômico carregando o alelo mutante derivado do cromossomo homólogo pareado. Uma vez que essa troca depende da troca de informação genética entre braços cromossômicos, os cromossomos participantes dela permaneceriam completos e,

Figura 7.8 Eliminação de cópias tipo selvagem do gene *Rb* Recombinação mitótica pode levar à perda de heterozigidade (LOH) de um gene como *Rb*. Material genético é trocado entre dois cromossomos homólogos (p. ex., os dois cromossomos 13) por meio do processo de permutação, ocorrendo na fase G_2 ou, menos frequentemente, na fase M do ciclo celular. Uma vez ocorrida a permutação, a segregação subsequente de cromátides pode gerar um par de células-filha que retenham a heterozigidade no loco *Rb*. Com igual probabilidade, esse processo pode gerar duas células-filha que tenham sofrido LOH no loco *Rb* (e outros loci no mesmo braço cromossômico), uma das quais é mutante homozigoto no loco *Rb* e a outra é tipo selvagem homozigoto neste loco.



quando visualizados no microscópio durante a metáfase subsequente, seriam indistinguíveis dos cromossomos que existiam previamente a essa troca genética. No entanto, ao nível genético e molecular, uma das células surgidas desse evento de recombinação teria perdido seu alelo tipo selvagem restante e teria se tornado, portanto, $Rb^{-/-}$. Notavelmente, essa recombinação mitótica ocorreria a uma frequência de 10^{-5} a 10^{-4} por geração celular e seria, assim, um modo bem mais fácil para uma célula se livrar da cópia tipo selvagem do gene Rb do que a inativação mutacional desta cópia, o que, como mencionado anteriormente, ocorreria a uma frequência de cerca de 10^{-6} por geração celular.

Previamente a essa recombinação mitótica, os dois cromossomos homólogos (no caso do gene Rb , os dois cromossomos 13 humanos) diferem um do outro em muitos detalhes sutis. Além disso, um é de origem paterna, e o outro, de origem materna, indicando que eles são heterozigotos em muitos *loci* genéticos. Entretanto, seguindo a recombinação mitótica que leva à homozigosidade no loco Rb (gerando ou um genótipo $Rb^{-/-}$ ou $Rb^{+/+}$), muitos outros genes próximos do Rb no cromossomo 13 também perderão heterozigosidade e se tornarão homozigotos. Essa alteração de um gene ou região cromossômica é geralmente chamada de perda de heterozigosidade ou, simplesmente, LOH. (Um termo alternativo é “deleção alélica”.) De maneira interessante, eventos de LOH podem ocorrer com diferentes frequências em diferentes populações humanas (Barra lateral 7.2).

Barra lateral 7.2 Endogamia leva a altas taxas de LOH? Experimentos com camundongos de laboratório e livres indicam que a frequência de recombinação mitótica pode ser suprimida dez vezes ou mais se cromossomos homólogos forem geneticamente muito diferentes um do outro em vez de geneticamente similares ou idênticos. Isso indica que o pareamento de cromossomos homólogos que possibilita a ocorrência de recombinação mitótica depende da extensiva identidade de sequência nos dois DNAs.

Esse resultado pode ter implicações importantes para a progressão de tumor em humanos. Em muitas populações humanas, **endogamia** (cruzamento dentro de um grupo), e mesmo casamentos entre primos de 1º grau, são bastante comuns. A genética mendeliana dita que na prole de tais indivíduos, regiões cromossômicas de homozigosidade são frequentes. Se os resultados de genética de camundongo são instrutivos, então pares de cromossomos homólogos são mais suscetíveis de sofrer recombinação mitótica nesses indivíduos. Se um dos dois cromossomos carregar uma mutação em um gene supressor de tumor como Rb , a recombinação mitótica e LOH levando à perda da cópia tipo selvagem restante desse gene supressor de tumor se tornará mais prováveis. Consequentemente, talvez a prole de casamentos entre primos em populações humanas tenha maior suscetibilidade a tumores simplesmente porque seus cromossomos participam com mais frequência de LOH. Esta especulação não foi testada.

Há ainda outros meios pelos quais cromossomos podem atingir LOH. Um desses deriva do processo de conversão gênica (Figura 7.9). Nesse mecanismo alternativo, uma fita de DNA sendo alongada durante a replicação de DNA em um cromossomo formará um híbrido com a fita de DNA complementar presente no cromossomo homólogo. A fita será então estendida por uma DNA polimerase, usando a fita do segundo cromossomo como um molde, antes de se soltar desse cromossomo e novamente anelar com a fita complementar do cromossomo em que sua síntese começou. Após, esta fita continuará a ser estendida usando como molde a fita de DNA na qual se originou. Assim, essa fita de DNA recentemente sintetizada adquirirá sequências de DNA de um trecho do cromossomo pareado. Se essa conversão gênica envolver a cópia de um alelo Rb já inativo, por exemplo, então novamente LOH terá ocorrido nessa região cromossômica. Tal conversão gênica ocorre até mais frequentemente por geração de célula do que por recombinação mitótica.

Como descrito anteriormente, a troca de informação cromossômica entre dois cromossomos, ocorrendo por qualquer mecanismo, pode envolver um grande número de genes e marcadores genéticos flanqueando o loco Rb nos dois lados. Seu comportamento será também de interesse. Previamente a essa troca, podemos imaginar que muitos genes e sequências genéticas no braço longo do cromossomo 13 (onde localiza-se o gene Rb) estarão também presentes em configuração heterozigótica. Posteriormente, eles terão também sofrido LOH.

Por exemplo, o loco Rb , o qual pode originalmente (em uma célula de câncer incipiente) ter estado na configuração $Rb^{+/-}$, pode agora tornar-se $Rb^{-/-}$ ou $Rb^{+/+}$. Ao mesmo tempo, uma sequência marcadora genética em uma região vizinha do cromossomo que era inicialmente AAGCC/AAGTC (logo heterozigota) pode agora tornar-se ou AAGCC/AAGCC ou AAGTC/AAGTC (portanto, homozigota). Com efeito, esse segmento de sequência vizinho foi carregado juntamente com o gene Rb próximo durante a troca de sequências entre os dois cromossomos homólogos.

Como se pensava que LOH ocorria a uma frequência bem mais alta do que alterações mutacionais de genes, isso significava que a segunda cópia gênica, ainda intacta, era bem mais provável de ser perdida por LOH do que por um evento mutacional que atingia essa cópia. Consequentemente, a maioria das células de retinoblastoma foi predita como apresentando LOH no loco Rb e em marcadores genéticos próximos no cromossomo 13, e apenas uma pequena minoria foi predita como carregando dois alelos mutantes distintos de Rb , cada um desativado por um evento mutacional independente.

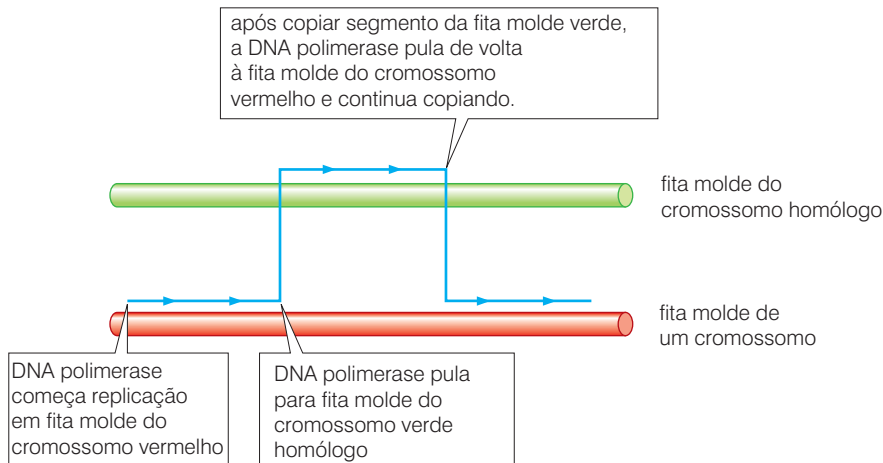


Figura 7.9 Conversão gênica Durante o processo de conversão gênica, DNA polimerases inicialmente começam a usar uma fita em um cromossomo (*vermelho*) como um molde para a síntese de uma nova fita de DNA filha (*azul*). Após avançar alguma distância nesta fita nova, a polimerase pode continuar a replicação pulando para o cromossomo homólogo e usando a fita de DNA deste outro (*verde*) como molde para a elongação contínua da fita filha. Após um tempo, a polimerase pode voltar à fita molde de DNA originalmente usada e continuar a replicação. Dessa maneira, um alelo mutante de um gene supressor de tumor, tal como um alelo mutante de *Rb*, pode ser transmitido de um cromossomo para seu homólogo, substituindo o alelo tipo selvagem que lá existia.

7.5 O gene *Rb* frequentemente sofre perda de heterozigotidade em tumores

Em 1978, a localização cromossômica do gene *Rb* foi obtida do estudo dos cromossomos presentes em retinoblastomas. Em um pequeno número de tumores retinais, análise cariotípica cuidadosa de espalhamento de cromossomo metafásico revelou deleções intersticiais (veja a Barra lateral 1.3) dentro do braço longo (“q”) do cromossomo 13. Apesar de cada uma dessas deleções começar e terminar em sítios diferentes nesse braço cromossômico, elas compartilhavam o fato de que todas causavam perda de material cromossômico na quarta banda da primeira região desse braço, isto é, 13q14 (Figura 7.10). As deleções intersticiais afetando essa banda cromossômica envolviam muitas centenas, muitas vezes milhares, de quilobases de DNA, indicando que um número de genes nessa região tinha sido descartado simultaneamente pelas células de tumor retinal em desenvolvimento. O fato de que tais mudanças envolviam a *perda* de informação genética proveu evidência de que o gene *Rb*, o qual foi pensado situar-se em algum lugar nessa região cromossômica, tinha sido descartado – precisamente a consequência predita pela teoria dos genes supressores de tumor. (Na grande maioria dos retinoblastomas, as mutações que fazem o nocaute do gene *Rb* afetam um número bem menor de seqüências nucleotídicas e são, portanto, **submicroscópicas**, isto é, invisíveis pela análise microscópica de espalhamento de cromossomo metafásico.)

Por sorte, um segundo gene na região cromossômica 13q14 tinha sido razoavelmente bem caracterizado quando *Rb* foi mapeado. Esse gene, que codifica a enzima esterase D, é representado no conjunto de genes humanos por dois alelos distintos cujos produtos protéicos migram a diferentes taxas em gel de eletroforese (Figura 7.11). O loco da esterase D apresentou aos geneticistas uma oportunidade de ouro para testar a teoria de LOH. Lembre que quando LOH ocorre, uma região cromossômica inteira é afetada. Assim, uma vez que o loco da esterase D encontra-se próximo ao loco do gene *Rb* no braço longo do cromossomo 13, se o loco de *Rb* sofrer LOH durante o desenvolvimento de tumor, então o loco da esterase D deveria frequentemente sofrer o mesmo destino. De fato, o loco da esterase D poderia agir como um “marcador substituto” para o ainda misterioso, não-clonado, gene *Rb*.

Figura 7.10 Localização cromossômica do loco *Rb* (A) A presença de bandas coradas escuras distintas em cromossomos humanos tornou possível delinear sub-regiões específicas em cada cromossomo (*esquerda*). Neste caso, estudo cuidadoso do cariótipo de células de retinoblastoma, feita nos cromossomos condensados de células em prófase tardia ou metáfase, revelaram a presença de uma deleção afetando o braço longo (q) do cromossomo 13, em um paciente de 6 anos de idade com retinoblastoma (*seta, esquerda*), enquanto os cromossomos 14 e 15 pareceram normais. (B) Análise citogenética cuidadosa revelou que a deleção foi localizada entre as bandas 13q12 e q14 (*direita*), isto é, entre a segunda e quarta bandas da primeira região do braço longo (q) do cromossomo 13. (A, de U. Franck, *Cytogenet. Cell Genet.* 16:131-134, 1976.)

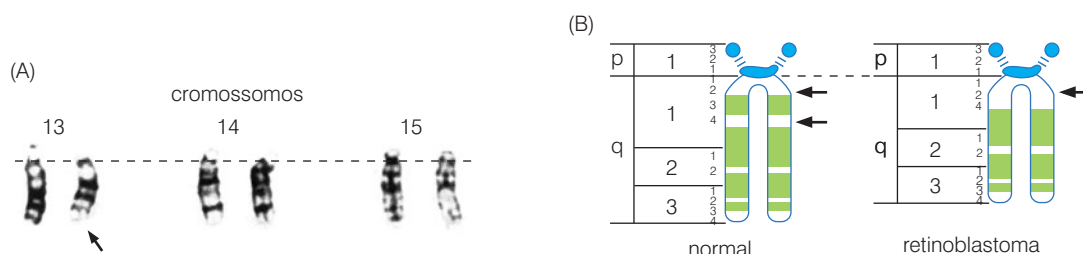
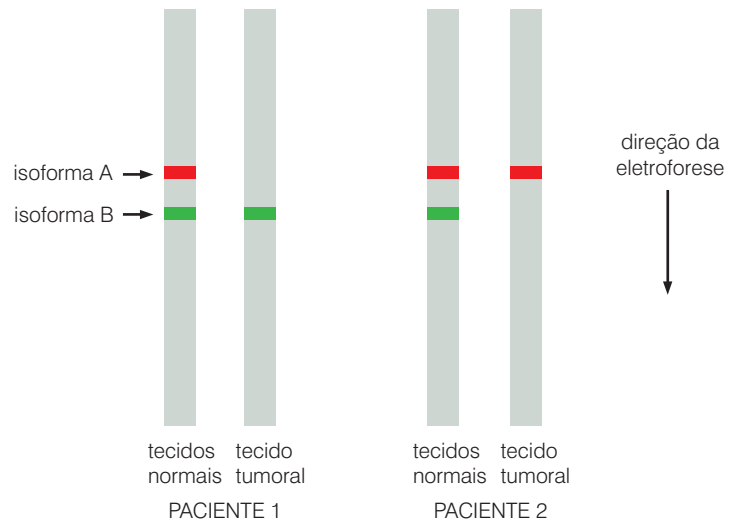


Figura 7.11 Demonstração de perda de heteroziguidade no loco *Rb*. Estes zimogramas representam análises nas quais as duas formas diferentes (*isoformas*) da enzima esterase D são separadas por eletroforese em gel. A presença dessas enzimas pode então ser registrada por uma reação bioquímica que é conduzida pela enzima e gera um produto, visualizado aqui como uma banda em um gel. Em um paciente de retinoblastoma que era heterozigoto no loco da esterase D, tecidos normais especificavam duas formas dessa enzima, vistas aqui como duas bandas distintas, enquanto o tecido tumoral especificava apenas uma forma da enzima, indicando perda de heteroziguidade (LOH) nesse loco nas células tumorais. Comparações da esterase D em células normais e tumorais de outro paciente de retinoblastoma também revelaram LOH no loco da esterase D em células tumorais – nesse caso, resultando da perda da região cromossômica que especifica a outra isoforma da enzima. (Adaptada de R.S. Sparkes et al., *Science* 219:971-973, 1983.)



Na verdade, quando pesquisadores examinaram as células tumorais de várias crianças que nasceram heterozigotas no loco da esterase D (tendo herdado dois alelos de esterase D distintos de seus pais), eles perceberam que essas células tumorais tinham perdido um alelo de esterase D e, assim, deviam ter sofrido LOH (veja a Figura 7.11). Uma análise similar feita naquela época usando marcadores de sequência de DNA polimórfico chegou à mesma conclusão – sobre LOH no gene *Rb*. Essas descobertas, de 1983, proveram uma prova formal e convincente da noção de que o gene vizinho *Rb* também sofria, com frequência, LOH em tumores; assim, seu comportamento adequava-se ao comportamento teorizado para um gene supressor de crescimento, cujas cópias precisavam ser descartadas antes do crescimento incontrolado das células.

Note que LOH pode também ser alcançada simplesmente pela quebra e descarte de uma região cromossômica inteira sem que esta seja substituída por uma cópia duplicada do cromossomo homólogo (veja a Barra lateral 7.3). Isso resulta em **hemiziguidade** dessa região cromossômica, em que agora todos os genes nesse braço cromossômico estão presentes apenas em uma cópia única, em vez das duas cópias usuais por célula. Células podem sobreviver com apenas uma cópia de algumas regiões cromossômicas, enquanto a perda de uma única cópia de outras regiões parece colocá-las em uma distinta desvantagem.

Barra lateral 7.3 Perda de heteroziguidade pode ocorrer ainda por outros mecanismos Em muitos tumores, LOH parece ser atingida pela perda de um cromossomo inteiro devido à segregação cromossômica inapropriada na mitose (o processo de **não-disjunção**). O cromossomo sobrevivente, o qual pode carregar um alelo mutante de um gene como *Rb*, pode subsequentemente ser duplicado, produzindo dois cromossomos idênticos, cujos genes estão presentes em configuração homozigota. Alternativamente, exame detalhado de complementos cromossômicos em células de carcinoma de cólon humano mostra que, pelo menos nestes cânceres, LOH é frequentemente alcançada via alterações genéticas que modificam a estrutura cromossômica e, portanto, afetam o cariótipo das células. Muitos desses eventos parecem ser translocações, nas quais eles envolvem recombinação entre braços cromossômicos em cromossomos não-homólogos. Tais eventos de recombinação podem ser disparados por quebras no DNA dupla-fita seguidas por fusão das extremidades resultantes com sequências de DNA originadas em outros cromossomos. Dessa maneira, algumas regiões genéticas podem ser duplicadas e outras perdidas. Mais tarde (Seção 10.4), discutiremos um mecanismo molecular específico pelo qual tais recombinações não-homólogas podem ocorrer durante o desenvolvimento de um tumor.

gem biológica. Quando a perda de um segmento cromossômico ocorre de fato (gerando hemizigidade), esse evento é registrado como uma LOH, pois somente uma versão alélica de um gene nessa região cromossômica pode ser detectada enquanto previamente dois alelos distintos estavam presentes. Não importa como LOH ocorre, a consequência final, em termos de tumorigênese, é alcançada – eliminação do alelo tipo selvagem restante de um gene supressor de tumor.

Em 1986, o gene *Rb* foi clonado e se soube, como especulado previamente, que ele sofria mutações que resultavam em sua desativação (Figura 7.12). Em alguns retinoblastomas, tais mutações envolviam grandes deleções dentro do gene *Rb* e seqüências de DNA vizinhas. *Southern blotting* do DNA desses tumores revelou que o alelo *Rb* resultante estava presente em configuração homozigota. Isso significava que, após a criação de um alelo nulo (inativo) de *Rb* em um cromossomo, a região correspondente no outro cromossomo homólogo foi descartada, levando à perda de heterozigidade (LOH) nesse loco. Tais dados validaram, diretamente, muitas das previsões dos modelos teóricos, que tinham sido propostos para explicar como genes supressores de tumor comportavam-se durante o desenvolvimento de cânceres.

Como mencionado, crianças que herdaram uma cópia defectiva do gene *Rb* são também predispostas a osteossarcomas (tumores ósseos) quando adolescentes. Com a sonda do gene *Rb* nas mãos, tornou-se possível demonstrar que esses osteossarcomas também carregavam genes *Rb* estruturalmente alterados (veja a Figura 7.12). Ao mesmo tempo, tais achados destacavam um “quebra-cabeça” que permanece sem solução até hoje: por que um gene como *Rb*, o qual opera em uma grande variedade de tecidos no corpo (como aprenderemos no Capítulo 8), causa predominantemente tumores de retina e de ossos quando é herdado na forma defectiva do pai ou da mãe? Por que todos os tecidos não estão com o mesmo risco?

7.6 Eventos de perda de heterozigidade podem ser usados para encontrar genes supressores de tumor

Acredita-se que numerosos genes supressores de tumor que operam como o gene *Rb* estão espalhados pelo genoma humano e desempenham um papel na patogênese de muitos tipos de tumores humanos. No final dos anos 1980, pesquisadores interessados em encontrar esses genes foram confrontados com uma dúvida experimental: como poderia alguém encontrar genes cuja existência era mais aparente quando eles estavam ausentes do genoma de uma célula? Os oncogenes que atuavam de maneira dominante, por outro lado, poderiam ser detectados bem mais prontamente por sua presença em um genoma de retrovírus, pelo ensaio de foco de transfecção ou por sua presença em um segmento cromossômico que repetidamente sofre amplificação gênica em um número de tumores surgidos independentemente.

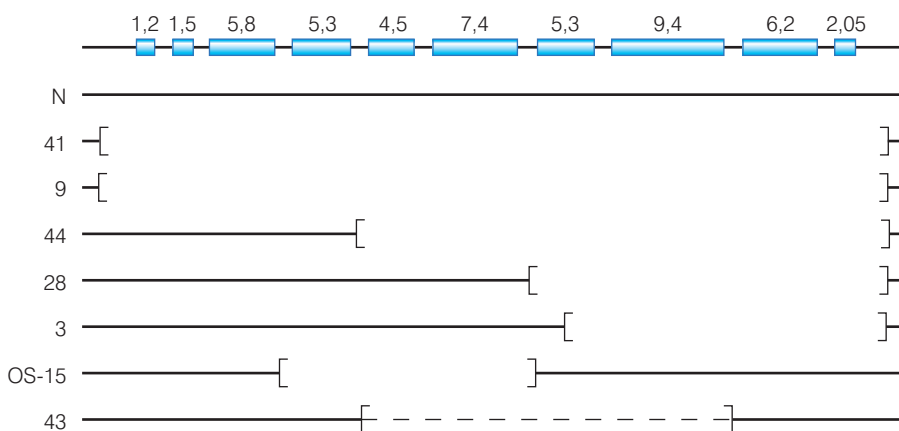


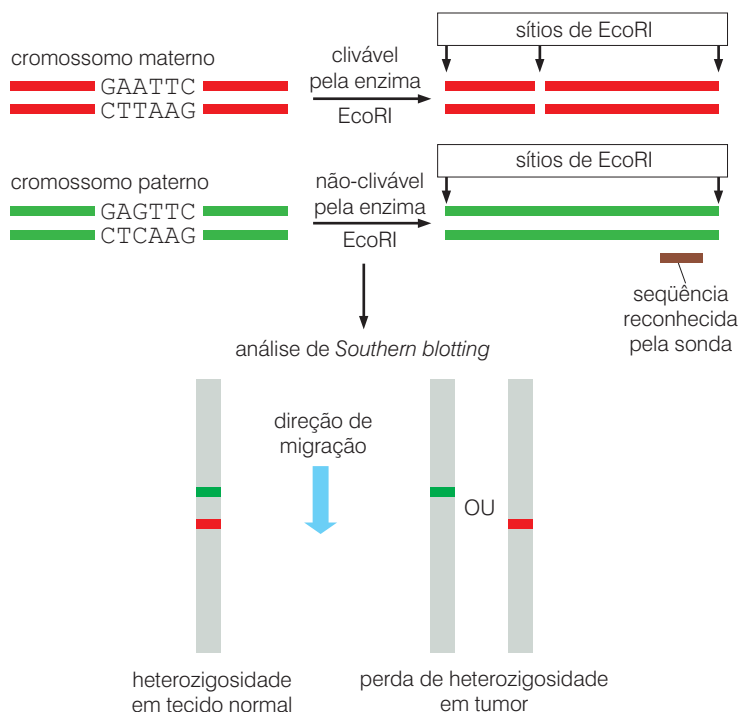
Figura 7.12 Mutações do gene *Rb* O cDNA de *Rb* clonado podia ser usado como uma sonda em análises de *Southern blot* de DNA genômico de uma variedade de retinoblastomas e um osteossarcoma. Cada um dos 10 éxons do gene *Rb* (cilindros azuis) é marcado por seu comprimento em quilobases. A versão normal (N) do gene ocupa uma região cromossômica de aproximadamente 190 quilobases. Entretanto, a análise de um subconjunto de DNA de retinoblastoma indicou que porções significativas do gene *Rb* tinham sofrido deleção. Os pontos iniciais e finais dessas deleções estão indicados por colchetes. Assim, tumores 41 e 9 perderam o gene *Rb* inteiro, aparentemente junto com segmentos cromossômicos de DNA vizinhos nos dois lados. Tumores 44, 28 e 3 perderam, em diferentes níveis, a metade direita do gene junto com segmentos cromossômicos à direita. O fato de que um osteossarcoma (OS-15) e um retinoblastoma (43) perderam porções internas do gene *Rb* é muito sugestivo de que este segmento de DNA de 190 kb, e não segmentos de DNA à esquerda e à direita, foi o alvo repetido de desativação mutacional ocorrendo durante o desenvolvimento desses retinoblastomas e do osteossarcoma. (A linha tracejada indica que a deleção no tumor 43 estava presente em configuração heterozigota.) (De S.H. Friend et al., *Nature* 323:643-646, 1986.)

Uma estratégia mais geral era requerida, que não dependesse da observação ao acaso de deleções cromossômicas intersticiais ou da presença de um gene conhecido (p. ex., esterase D) que, por sorte, estivesse próximo a um gene supressor de tumor em um cromossomo. Ambas as condições facilitavam muito o isolamento do gene *Rb*. Em geral, entretanto, as buscas pela maioria dos genes supressores de tumor não foram favorecidas por tais arroubos de boa sorte.

A tendência de genes supressores de tumor em sofrer LOH durante desenvolvimento de tumor proveu aos pesquisadores do câncer uma nova estratégia genética para rastreá-los. Como a região cromossômica ao redor do gene supressor de tumor parecia sofrer LOH juntamente com o próprio gene supressor de tumor, seria possível detectar a existência de um gene supressor de tumor ainda não clonado simplesmente pelo fato de que um marcador genético anônimo localizado próximo no cromossomo sofre LOH repetidamente durante o desenvolvimento de um tipo específico de tumor humano. Embasando esse argumento, podemos considerar o gene da esterase D (Seção 7.5) comportando-se precisamente como um marcador genético anônimo (embora conheçamos seu papel como um gene de uma enzima bem-caracterizada). (Enquanto LOH é responsável pela eliminação de muitas segundas cópias sobreviventes de genes supressores de tumor tipo selvagem, algumas dessas cópias gênicas podem ocasionalmente ser perdidas por meio de outros mecanismos.)

Uma estratégia inicialmente explorada para monitorar heteroziguidade e sua perda usava certos segmentos de DNA que eram espalhados ao longo do genoma como marcadores genéticos. Esses segmentos de DNA não tinham qualquer afiliação óbvia com genes específicos. Em alguns indivíduos, tal segmento de DNA poderia ser clivado por uma enzima de restrição; em outros, o mesmo segmento de DNA era resistente à clivagem como resultado da substituição de um único par de bases na sequência reconhecida pela enzima de restrição (Figura 7.13). Porque tal variabilidade de sequência parecia ocorrer como uma consequência de variabilidade genética normal no conjunto de genes humanos, pensava-se que tais sítios representassem marcadores genéticos polimórficos. Além disso, uma vez que as versões alélicas dessa sequência ou permitem ou proíbem clivagem por uma enzima de restrição, tal marcador foi denominado como um **polimorfismo de tamanho de fragmento de restrição** (RFLP).

Figura 7.13 Polimorfismos de tamanho de fragmento de restrição e localização de genes supressores de tumor. A análise genética de regiões cromossômicas tem sido facilitada pelo uso de marcadores genéticos definidos pela presença ou ausência de um sítio de clivagem por endonuclease de restrição (enzima de restrição) em uma região de DNA cromossômico. Nesta ilustração, o segmento de DNA no cromossomo de origem materna (vermelho) pode ser clivado pela enzima EcoRI, enquanto o segmento homólogo derivado do pai (verde), por uma única substituição de um par de bases, resiste à clivagem; a presença ou ausência dessa substituição, portanto, representa um polimorfismo de tamanho de fragmento de restrição (RFLP). Um sonda radioativa que reconhece a extremidade direita do segmento paterno pode então ser usada em análise de *Southern blot* para determinar se a clivagem ocorreu ou não (abaixo). A presença ou ausência de um fragmento de clivagem torna possível, por sua vez, rastrear a herança de sequências de DNA que comportam-se geneticamente como alelos mendelianos. Neste exemplo, dois tecidos normais de pacientes com câncer mostram heteroziguidade nesta região cromossômica. No entanto, perda de heteroziguidade (LOH) ocorreu nos seus DNAs tumorais. Em um paciente, o alelo paterno foi perdido no DNA tumoral, enquanto no outro, o alelo materno foi perdido.



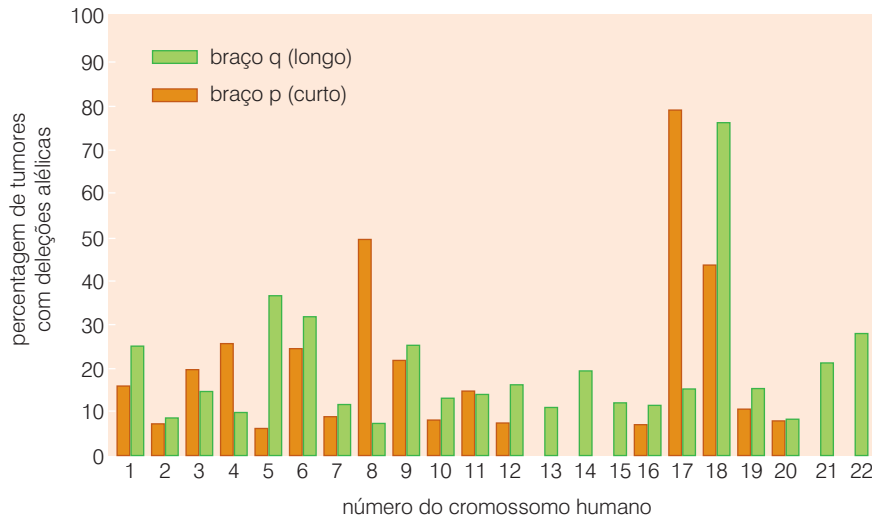


Figura 7.14 Perda de heteroziguidade de braços cromossômicos em cânceres de cólon Este gráfico de barras mostra o comportamento genético dos braços de cromossomos humanos em uma série de carcinomas colorretais, a qual foi analisada pelo uso de marcadores RFLP (veja a Figura 7.13). Os braços longos (q) de cromossomos humanos são indicados pelas *barras verdes*, enquanto os braços curtos (p), pelas *barras laranjas*. Alguns dos 22 cromossomos humanos (13, 14, 15, 21 e 22) são representados apenas pelas análises de seus braços longos (q). As “deleções alélicas” indicadas na ordenada são equivalentes a perdas de heteroziguidade (LOH). Essas análises representaram medidas bastante imprecisas das localizações de genes supressores de tumor críticos, uma vez que pouquíssimas sondas eram disponíveis àquela época para estimar LOH dentro de regiões circunscritas de cada braço cromossômico. (Além disso, o gene supressor de tumor APC, localizado no cromossomo 5q, o qual foi subsequentemente constatado ser desativado em quase todos os cânceres colorretais, é extremamente grande e, portanto, apresenta um alvo freqüente para inativação por mutação. Como consequência, seguindo a inativação da primeira cópia deste gene, a segunda cópia, ainda intacta, é freqüentemente perdida por uma segunda mutação independente, em vez de LOH, levando a uma subestimativa de seu envolvimento no desenvolvimento de câncer colorretal.) Esses dados também fornecem indicação clara de que o cromossomo 8p porta um gene supressor de tumor, o qual nunca foi identificado. (De B. Vogelstein et al., *Science* 244:207-211, 1989.)

Geneticistas do câncer usaram marcadores RFLP para determinar se várias regiões cromossômicas freqüentemente sofriam LOH durante o desenvolvimento de certos tipos de tumores. A Figura 7.14 mostra os resultados do uso de RFLP para procurar por regiões de LOH surgindo em um grupo de **tumores colorretais**, isto é, carcinomas do cólon e reto. Nesse caso, os braços longo e curto da maioria dos cromossomos foram representados por pelo menos um marcador RFLP, e o destino do braço cromossômico inteiro foi estudado. Note que nessa série de tumores humanos, o braço curto (p) do cromossomo 17 e o braço longo (q) do cromossomo 18 sofreram taxas estranhamente altas de LOH. Esses dois braços cromossômicos destacaram-se, subindo bem acima do nível basal de 15 a 20% de LOH, que afetou igualmente todos os braços cromossômicos nessas células tumorais.

(O nível basal de LOH, que afetou todos os braços cromossômicos nos tumores colorretais [Figura 7.14], revela o fato de que todas as regiões cromossômicas têm alguma tendência de sofrer LOH a uma certa taxa. Não obstante, se a LOH ocorre em uma região portando um gene supressor de tumor, a proliferação ou sobrevivência das células em que ela ocorreu pode ser favorecida, levando a alto número de tumores carregando essa LOH particular.)

O fato de que braços específicos dos cromossomos 17 e 18 freqüentemente sofriam LOH em tumores proveu forte evidência de que ambos os braços portavam genes supressores de tumor ainda desconhecidos que também sofriam LOH. Assim, essa localização genética proveu uma indicação clara aos clonadores de genes de onde, no genoma, eles deveriam procurar pelos genes supressores de tumor culpados que pareciam estar desempenhando papéis importantes no desenvolvimento desses tumores colorretais. Mais recentemente, geneticistas do câncer usaram outras estratégias moleculares para detectar polimorfismos de sequência nos genomas de células cancerosas (Barra lateral 7.4).

O uso de técnicas de mapeamento mais poderosas permitiu aos geneticistas plantar marcadores polimórficos mais densamente ao longo dos mapas genéticos de cada braço cromossômico. Em um dado braço cromossômico, foi constatado que alguns marcadores sofriam LOH mais freqüentemente do que outros. Claramente, quanto mais próximos esses marcadores estavam de um procurado gene supressor de tumor (i. e., quanto mais forte a ligação genética), maior era a probabilidade de que tais marcadores sofreriam LOH junto com o gene supressor de tumor. Do mesmo modo, marcadores localizados longe em um braço cromossômico eram menos prováveis de sofrer LOH junto com o gene supressor de tumor. Até agora, análises genéticas de DNAs preparados de vários tipos de tumores humanos têm revelado um grande número de regiões cromossômicas que freqüentemente sofrem LOH. Um subconjunto dessas regiões foi suscetível aos ataques dos clonadores de genes, resultando no isolamento de mais de 30 genes supressores de tumor (Tabela 7.1).

Barra lateral 7.4 A reação em cadeia da polimerase torna possível mapear geneticamente genes supressores de tumor rapidamente Nos últimos anos, o uso de RFLPs tem sido substituído por marcadores que podem ser detectados usando a reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificar segmentos cromossômicos específicos. Em uma forma simples dessa análise de LOH, um dos dois iniciadores em uma reação de PCR pode ser complementar a uma versão alélica de uma sequência de DNA que é polimórfica no conjunto de genes humanos; o outro iniciador liga-se a uma sequência na fita complementar que é invariável no conjunto de genes humanos. A capacidade do primeiro iniciador de

ligar-se a uma versão alélica da sequência e não à outra pode ser usada para determinar se o alelo particular está presente ou não em uma preparação de DNA (Figura 7.15). A capacidade de fazer múltiplos PCRs simultaneamente capacita geneticistas a investigar a configuração de muitos marcadores polimórficos ao mesmo tempo; isso facilitou a descoberta de milhares desses marcadores espalhados pelo genoma. A resultante densidade vastamente aumentada de marcadores ao longo de cada braço cromossômico torna possível localizar genes supressores de tumor bem mais precisamente do que o uso da rudimentar estratégia de mapeamento ilustrada na Figura 7.14.

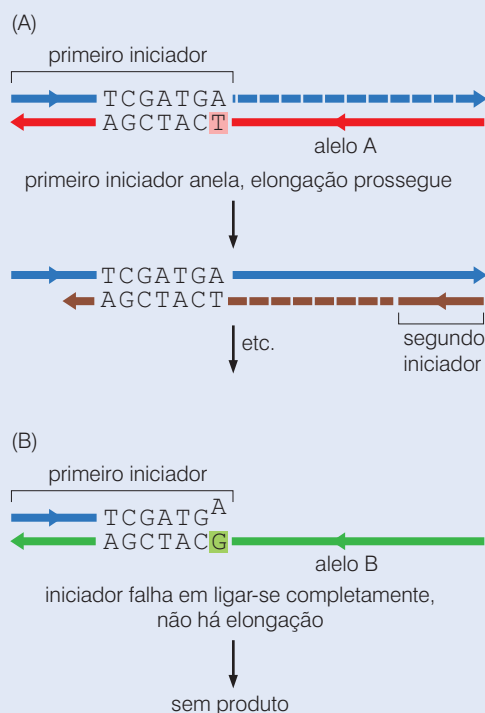


Figura 7.15 Uso da reação em cadeia da polimerase para determinar polimorfismo de sequência A reação em cadeia da polimerase (PCR) pode ser usada para determinar a presença ou ausência de um polimorfismo de um único nucleotídeo (SNP) – um polimorfismo em que os dois alelos diferem por um único nucleotídeo. (Dos 3 milhões ou mais de SNPs que foram catalogados no genoma humano, cerca de 29% estão presentes a uma frequência alélica de 5% ou mais no conjunto de genes humanos.) (A) Em uma versão deste procedimento, o primeiro iniciador (azul) é perfeitamente complementar a uma sequência alélica (fita vermelha), e, portanto, a reação de extensão do iniciador orientada para a direita (linha tracejada azul) prossegue normalmente, gerando assim um molde para a elongação orientada para a esquerda do segundo iniciador (linha tracejada marrom). (B) Não obstante, se o primeiro iniciador não é perfeitamente complementar à sequência presente no outro alelo (verde-claro), todas as extensões do iniciador para a direita falharão. Logo, a presença ou ausência de um SNP pode ser acessada pela presença ou ausência dos produtos de PCR resultantes, os quais acumularão a milhões de cópias em um conjunto de reações e estarão ausentes no outro. As cabeças das setas indicam a polaridade de 5' para 3' das fitas de DNA.

7.7 Muitos cânceres familiares podem ser explicados pela herança de genes supressores de tumor mutantes

Como o gene *Rb*, a maioria dos genes supressores de tumor clonados listados na Tabela 7.1 está envolvida em ambos os cânceres familiares e esporádicos. Em geral, a herança de cópias defectivas de muitos desses genes cria um risco muito aumentado de contrair-se um ou outro tipo específico de câncer, freqüentemente um tipo de tumor que, de outra forma, é relativamente raro na população humana. Em muitos casos, alelos mutantes da linhagem germinativa desses genes levam à suscetibilidade a múltiplos tipos de câncer, como é o caso do gene *Rb*.

Mais tarde neste capítulo, descreveremos em detalhes os mecanismos de ação de algumas das proteínas codificadas por genes supressores de tumor. Todavia, mesmo um rápido exame da Tabela 7.1 torna claro que tais genes especificam um arranjo diverso de proteínas que operam em muitos sítios intracelulares diferentes para reduzir o risco de câncer. Na verdade, uma função anticâncer é a única propriedade compartilhada por esses genes, do contrário não-relacionados. (Alguns dos genes supressores de tumor listados na Tabela 7.1 são conhecidos apenas por seu envolvimento em cânceres esporádicos; permanece incerto se alelos mutantes desses genes são transmitidos na linha germinativa e, assim, predispoem indivíduos a um ou outro tipo de câncer.)

Tabela 7.1 Genes supressores de tumor humanos que foram clonados

Nome do gene	Localização cromossômica	Síndrome do câncer familiar	Câncer esporádico	Função da proteína
<i>RUNX3</i>	1p36	—	Carcinoma gástrico	Co-fator TF
<i>HRPT2</i>	1q25-32	Tumores da paratireóide, fibromas de mandíbula	Tumores da paratireóide	Proteína da cromatina
<i>FH</i>	1q42.3	Leiomiomatose familiar ^a	—	Fumarato hidratase
<i>FHIT</i>	3p14.2	—	Muitos tipos	Diadenosina trifosfato hidrolase
<i>RASSF1A</i>	3p21.3	—	Muitos tipos	Múltiplas funções
<i>TGFBR2</i>	3p2.2	HNPCC	Carcinomas do cólon, gástrico, pancreático	Receptor de TGF-β
<i>VHL</i>	3p25	Síndrome de von Hippel-Lindau	Carcinoma de células renais	Ubiquitilação de HIF
<i>hCDC4</i>	4q32	—	Carcinoma do endométrio	Ubiquitina ligase
<i>APC</i>	5p21	Polipose colônica familiar adenomatosa	Carcinoma colorretal, pancreático, estomacal; carcinoma de próstata	Degradação de β-catenina
<i>NKX3.1</i>	8p21	—	Carcinoma de próstata	TF de <i>homeobox</i>
<i>p16^{INK4A} b</i>	9p21	Melanoma familiar	Muitos tipos	Inibidor de CDK
<i>p14^{ARF} c</i>	9p21	—	Todos os tipos	Estabilizador de p53
<i>PTC</i>	9q22.3	Síndrome do carcinoma de célula basal nevóide	Meduloblastomas	Receptor para GF de porco-espinho
<i>TSC1</i>	9q34	Esclerose tuberosa	—	Inibidor de mTOR ^f
<i>BMPR1</i>	10q21-22	Polipose juvenil	—	Receptor de BMP
<i>PTEN^d</i>	10q23.3	Doença de Cowden, carcinomas de mama e gastrointestinal	Glioblastoma; carcinomas de próstata, de mama, de tireóide	PIP ₃ fosfatase
<i>WT1</i>	11p13	Tumor de Wilms	Tumor de Wilms	TF
<i>MEN1</i>	11p13	Neoplasia endócrina múltipla	—	Modificação de histonas, repressor transcricional
<i>BWS/CDKN1C</i>	11p15.5	Síndrome de Beckwith-Wiedemann	—	Inibidor de CDK p57 ^{Kip2}
<i>SDHD</i>	11q23	Paraganglioma familiar	Feocromocitoma	Proteína mitocondrial ^e
<i>RB</i>	13q14	Retinoblastoma, osteossarcoma	Retinoblastoma; sarcomas; carcinomas de bexiga, mama, esofágico e de pulmão	Controle de E2Fs; repressão transcricional
<i>TSC2</i>	16p13	Esclerose tuberosa	—	Inibidor de mTOR ^f
<i>CBP</i>	16p13.3	Rubinstein-Taybi	AML ^g	Co-ativador de TF
<i>CYLD</i>	16q12-13	Cilindromatose	—	Enzima de desubiquitinação
<i>CDH1</i>	16q22.1	Carcinoma gástrico familiar	Cânceres invasivos	Adesão célula-célula
<i>BHD</i>	17p11.2	Síndrome de Birt-Hogg-Dube	Carcinomas de rim, hamartomas	Desconhecidas
<i>TP53</i>	17p13.1	Síndrome de Li-Fraumeni	Muitos tipos	TF
<i>NF1</i>	17q11.2	Neurofibromatose tipo 1	Carcinoma de cólon, astrocitoma	Ras-GAP
<i>BECN1</i>	17q21.23	—	Mama, ovário, próstata	Autofagia
<i>PRKAR1A</i>	17.q22-24	Neoplasia endócrina múltipla ^h	Tumores endócrinos múltiplos	Subunidade de PKA
<i>DPC4ⁱ</i>	18q21.1	Polipose juvenil	Carcinomas pancreático e de cólon	TGF-β TF
<i>LKB1/STK11</i>	19p13.3	Síndrome de Peutz-Jegher	Pólipo colônico hamartomatoso	Serina/treonina cinase
<i>RUNX1</i>	21q22.12	Disordem de plaquetas familiar	AML	TF
<i>SNF5^j</i>	22q11.2	Síndrome da predisposição rabdóide	Tumores rabdóides malignos	Remodelagem cromossômica
<i>NF2</i>	22q12.2	Síndrome da posição de neurofibroma	Schwanoma, meningioma;ependinoma	Ligação citoesqueleto-membrana

^aLeiomiomatose familiar inclui fibróides múltiplas, leiomiomas cutâneos e carcinoma de célula renal. O produto gênico é um componente do ciclo tricarboxílico.

^bTambém conhecido como *MTS1*, *CDKN2* e *p16*.

^cO homólogo humano do gene murino *p19^{ARF}*.

^dTambém chamado *MMAC* ou *TEP1*.

^e*SDHS* codifica a subunidade D da succinato-ubiquinona oxidorreductase, um componente do complexo II da cadeia respiratória mitocondrial.

^fmTOR é uma serina/treonina cinase que controla, entre outros processos, a taxa de tradução e ativação de Akt/PKB. TSC 1 (hamartina) e TSC2 (tuberina) controlam tamanho e proliferação celular.

^gO gene *CBP* está envolvido em translocações cromossômicas associadas com AML. Essas translocações podem revelar o papel de um segmento de CBP como um oncogene mais do que como um gene supressor de tumor.

^hTambém chamado complexo Carney.

ⁱCodifica a Smad4 TF associada com sinalização de TGF-β; também conhecido como *MADH4* e *SMAD4*.

^jA proteína SNF5 humana é um componente do grande complexo Swi/Snf, que é responsável pela remodelagem da cromatina de uma maneira que leva à repressão transcricional por meio da ação de histona desacetilases. A síndrome da predisposição rabdóide envolve suscetibilidade a tumores teratóide/rabdóide atípicos, carcinomas do plexo coróide, meduloblastomas e tumores rabdóides extra-renais.

Adaptada em parte de E.R. Fearon, *Science* 278: 1043-150, 1997; e em parte de D.J. Marsh and R.T. Zori, *Cancer Lett.* 181:125-164, 2002.

Barra lateral 7.5 Por que os genes supressores de tumor mutantes são transmitidos pela linhagem germinativa enquanto proto-oncogenes mutantes em geral não são? Um número de síndromes de câncer familiar tem sido associado com a transmissão de alelos mutantes de linhagem germinativa de genes supressores de tumor (veja a Tabela 7.1). Entretanto, com raras exceções, alelos mutantes de proto-oncogenes (i. e., oncogenes ativados) não são responsáveis por predisposição inata ao câncer. Como podemos entender essa dramática diferença?

Mutações que geram oncogenes ativados provavelmente aumentam com alguma frequência durante a **gametogênese** – o processo que forma espermatozoides e óvulos – e assim são provavelmente transmitidos para óvulos fertilizados. Todavia, porque oncogenes agem ao nível celular como alelos dominantes, esses alelos mutantes provavelmente perturbam o comportamento de células individuais no embrião em desenvolvimento e, assim, interrompem o desenvolvimento de tecidos normais. Como con-

seqüência, embriões carregando esses alelos mutantes de oncogenes provavelmente não se desenvolvem completamente, e esses alelos mutantes desaparecerão da linhagem germinativa de uma família e então do conjunto de genes da espécie. (p. ex., experimentos reportados em 2004 indicam que embriões de camundongos oriundos de espermatozoides carregando um oncogene *K-ras* ativado mutante desenvolvem-se somente ao tempo de meia-gestação, ponto no qual eles morrem por causa de defeitos de desenvolvimento placentário e intra-embriônico; veja, entretanto, a Barra lateral 5.8)

Alelos mutantes de linhagem germinativa de genes supressores de tumor comportam-se de maneira bem diferente, contudo. Uma vez que são recessivos ao nível celular, sua presença na maioria das células de um embrião não será aparente. Por essa razão, a presença de genes supressores de tumor mutantes herdados será frequentemente compatível com desenvolvimento embrionário normal, e os fenótipos cancerígenos que ela cria se tornarão aparentes apenas em um pequeno número de

células e após grande atraso, permitindo que um indivíduo carregue esses alelos para desenvolver-se normalmente e, como é frequentemente o caso, sobreviver até a idade adulta tardia.

Além disso, se genes supressores de tumor mutantes sofrerem LOH em uma a cada 10^4 ou 10^5 células e se um homem adulto tem muito mais do que 10^{13} células, por que uma pessoa herdando um gene supressor de tumor mutante não é afligido por dezenas de milhares, mesmo milhões, de tumores? A resposta vem do fato de que tumorigênese é um processo de múltiplas etapas (como veremos no Capítulo 11). Isso implica que um gene mutante (seja ele um oncogene ou um gene supressor de tumor) pode ser necessário para formação de tumor, mas não será, sozinho, suficiente. Logo, muitas células em um indivíduo que herdou um gene supressor de tumor mutante podem sofrer LOH desse gene, mas somente uma pequena minoria delas irá adquirir as mudanças genéticas adicionais necessárias para formar um tumor clinicamente detectável.

Enquanto a herança de um alelo mutante de um gene supressor de tumor provavelmente aumenta muito o risco de câncer, a recíproca não é verdadeira: nem todas as síndromes de câncer familiares podem ser rastreadas até um alelo de gene supressor de tumor herdado. Como discutiremos mais tarde, no Capítulo 12, alelos mutantes de linhagem germinativa de uma segunda classe de genes também causam predisposição ao câncer. Esses outros genes são responsáveis pela manutenção do genoma celular e, portanto, agem para reduzir a probabilidade de mutações e anormalidades cromossômicas. Como a patogênese do câncer depende do acúmulo, por células individuais, de mutações somáticas em seus genomas, agentes que reduzem a taxa de mutação, como esses genes de manutenção do genoma, são muito efetivos na supressão do estabelecimento do câncer. Reciprocamente, defeitos na manutenção do genoma com frequência levam a um desastroso aumento no risco de câncer, porque aumentam a taxa de mutação.

Então percebemos que há duas classes distintas de genes de câncer familiar – os genes supressores de tumor, descritos neste capítulo, e os genes de manutenção do genoma, descritos no Capítulo 12. Podemos racionalizar a distinção entre as duas classes de genes como segue. Os genes supressores de tumor funcionam para controlar diretamente a biologia de células afetando sua proliferação, diferenciação ou morte; genes que funcionam dessa maneira são às vezes chamados de *gatekeepers*, para indicar seu papel na permissão ou negação do progresso de células em ciclos de crescimento de divisão. Os genes de manutenção de DNA afetam a biologia celular apenas indiretamente pelo controle da taxa à qual células acumulam genes mutantes; esses genes têm sido chamados de *caretakers*, para refletir seu papel na manutenção dos genomas celulares. Diferentemente de alelos mutantes de *gatekeepers* e *caretakers*, versões mutantes de proto-oncogenes são raramente transmitidas por meio da linhagem germinativa (Barra lateral 7.5).

7.8 Metilação de promotor representa um importante mecanismo para inativação de genes supressores de tumor

Moléculas de DNA podem ser alteradas covalentemente pela ligação de grupos metila a bases citosina. Uma pesquisa recente indica que essa modificação do DNA genômico é tão impor-

tante quanto mutação em silenciar genes supressores de tumor. Em células de mamífero, essa metilação é encontrada somente quando as bases citosina estão localizadas em uma posição 5' a guanosinas, isto é, na sequência CpG. (Essa modificação MeCpG é frequentemente denominada “CpG metilada”, embora apenas a citosina seja metilada.) Tal metilação pode afetar o funcionamento do DNA nessa região do cromossomo. Mais especificamente, quando a metilação de CpG ocorre na vizinhança de um promotor gênico, pode causar repressão da transcrição do gene associado. Reciprocamente, quando grupos metila são removidos de um conjunto de CpGs metiladas associadas ao promotor do gene, a transcrição desse gene em geral é desreprimada.

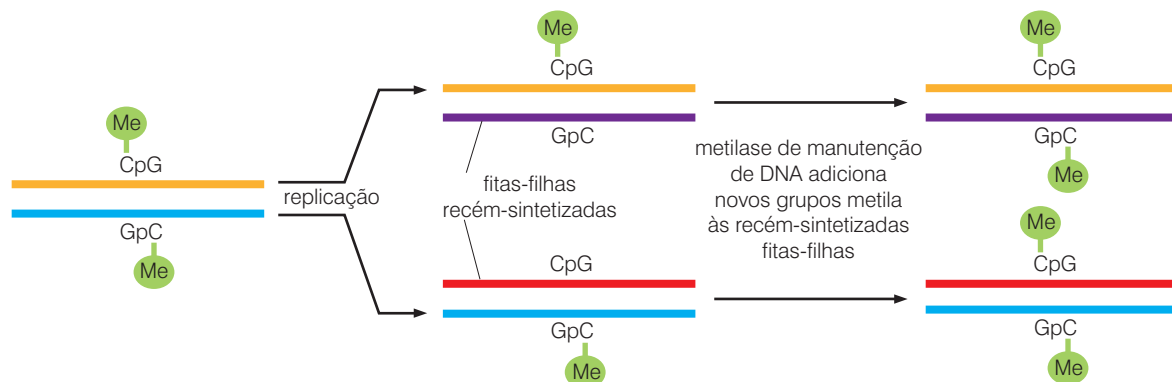
Os modos pelos quais o estado metilado de CpGs afeta a transcrição não são inteiramente conhecidos. Entretanto, um mecanismo muito importante já foi revelado. Foram encontrados complexos protéicos que incluem uma subunidade que pode reconhecer e ligar-se a CpGs metiladas no DNA e uma segunda subunidade que funciona como uma enzima histona desacetilase (HDAC). Uma vez que esses complexos estão ligados ao DNA, a histona desacetilase começa a remover grupos acetato, os quais são ancorados às cadeias laterais de aminoácidos de moléculas de histona na cromatina circundante. A desacetilação resultante das histonas inicia uma sequência de eventos que converte a cromatina de uma configuração que favorece a transcrição em uma que bloqueia a transcrição.

O exame minucioso de CpGs em DNA celular revela que as sequências de dinucleotídeos na fita complementar (também CpGs quando lidas na direção 5' para 3' nessa fita) quase invariavelmente contêm MeCpGs. Assim, quando um segmento de DNA é replicado na fase S, as CpGs na fita filha recém-formada, opostas às MeCpGs na parental complementar, são inicialmente não-metiladas. Essa deficiência é então rapidamente remediada por uma classe de enzimas, denominadas **metilases de manutenção**, que ancoram grupos metila às CpGs recém-sintetizadas (Figura 7.16).

As ações de metilases de manutenção indicam que, em princípio, o estado de metilação de uma sequência CpG pode ser mantido por muitos ciclos de replicação de DNA de uma maneira tão estável quanto a manutenção de sequências de nucleotídeos do DNA. Assim, o estado de metilação de CpGs é também uma propriedade herdável que pode ser passada de uma célula para suas filhas. Não obstante, embora herdável, a metilação de DNA não altera a sequência nucleotídica do DNA e, portanto, é considerada um mecanismo não-genético, isto é, **epigenético**, para controle da expressão gênica.

Uma sequência CpG específica é frequentemente metilada em algumas células de um organismo e não-metilada em outras. Isso implica que a metilação de DNA é reversível. Assim, podem existir enzimas que removem grupos metila de CpGs (embora elas não tenham sido descobertas ainda). Alternativamente, quando DNA é replicado, a metilação de uma CpG na nova fita formada pode ser bloqueada, embora a CpG complementar na fita parental seja metilada; quando essa nova fita formada é copiada no ciclo subsequente de replicação, a

Figura 7.16 Manutenção de metilação de DNA após replicação Quando uma dupla hélice de DNA metilada em sítios CpGs complementares (*grupos metila verdes, esquerda*) sofre replicação, as recém-sintetizadas hélices filhas inicialmente não terão grupos metila ancorados a CpGs na recém-sintetizada fita filha e serão, portanto, *hemimetiladas*. Logo após sua síntese, no entanto, uma metilase de manutenção de DNA detectará o DNA hemimetilado e ancorará grupos metila (*verdes*) a essas CpGs, assim regenerando a mesma configuração de grupos metila que existia na hélice parental previamente à replicação. Sítios de CpG não-metilados na hélice parental (*não-mostrados*) serão ignorados pela metilase de manutenção e, portanto, permanecerão assim nas próximas fitas sintetizadas.



dupla hélice resultante não terá grupos metila nessa posição nas duas fitas. Agindo na direção oposta, são conhecidas enzimas que ancoram grupos metila a CpGs previamente não-metiladas; tais enzimas são chamadas **metilases *de novo***, para distingui-las das metilases de manutenção que perpetuam um padrão de metilação pela ligação de grupos metila a DNAs recém-sintetizados (veja a Figura 7.16).

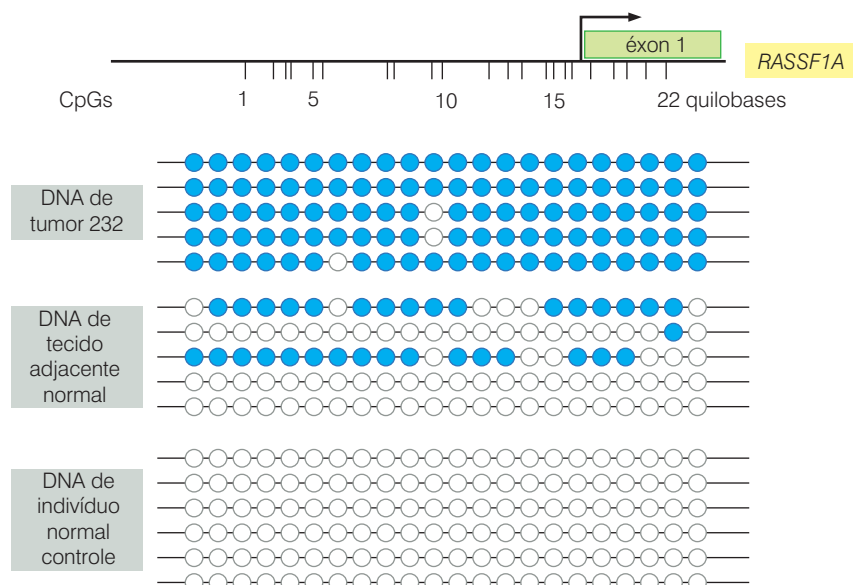
A metilação de CpGs, que não é encontrada em metazoários, é uma invenção inteligente. Assim, decisões sobre o estado transcricional de muitos genes são tomadas cedo na embriogênese. Uma vez tomadas, tais decisões devem ser passadas para as células descendentes em várias partes do embrião em crescimento. Já que a metilação de CpG pode ser transmitida de célula para célula por meio de herança, ela representa um modo altamente efetivo de assegurar que células descendentes, muitas gerações após um embrião, continuem a respeitar e reforçar as decisões tomadas por suas ancestrais no embrião.

No genoma de células de câncer, podemos imaginar que os mecanismos que determinam se o DNA é metilado de maneira apropriada podem falhar ocasionalmente. Esses mecanismos reguladores importantes são pouco entendidos ainda. Os resultados desse mau funcionamento são duas mudanças opostas no estado de metilação de genomas de células tumorais. Ao longo do desenvolvimento de um tumor, o nível geral de metilação no genoma com frequência decresce progressivamente. Isso indica que, por razões desconhecidas, as metilases de manutenção falham no cumprimento efetivo da sua tarefa. Muito dessa “hipometilação global” pode ser atribuído à perda de grupos metila ligados ao DNA de seqüências muito repetidas no genoma das células; essa perda é correlacionada com instabilidade cromossômica, porém permanece incerto se isso realmente causa esta instabilidade.

Independentes dessa hipometilação global, há, em geral, regiões localizadas de DNA – regiões com uma alta densidade de CpGs chamadas “ilhas de CpGs” – as quais tornam-se metiladas inapropriadamente no genoma de células cancerígenas. As ilhas de CpGs são normalmente relacionadas com os promotores dos genes (Figura 7.17); isso significa que as metilases *de novo* estão realmente silenciando certos genes que deveriam permanecer transcionalmente ativos.

A metilação de CpG é efetiva no silenciamento da expressão de um gene somente se ela ocorrer dentro das seqüências promotoras de tal gene; reciprocamente, a metilação de se-

Figura 7.17 Metilação do promotor *RASSF1A* A técnica de seqüenciamento de bissulfito foi usada aqui para determinar o estado de metilação da “ilha de CPG” na qual o promotor do gene supressor de tumor *RASSF1A* encontra-se. Cada círculo indica o sítio de um dinucleotídeo CpG distinto nesta ilha, cuja localização dentro do *RASSF1A* é também indicada por um tracejado vertical no mapa (*acima*). Círculos preenchidos (*azuis*) indicam que uma CpG foi encontrada metilada, enquanto círculos em branco indicam que ela está não-metilada. Análises de cinco amostras de DNA de tumor 232 indicam metilação em quase todos os sítios de CpGs na “ilha *RASSF1A*”; adjacente, tecido normal está não-metilado na maioria, mas não em todas as análises desta “ilha de CpG”. (Estes dados sugerem a presença de algumas células anormais com DNA metilado no tecido normal adjacente ao tumor 232.) (Cortesia de W.A. Schulz e A.R. Fiori.)



quências de DNA no corpo do gene, como seqüências exônicas, parece ter pequeno, se algum, efeito no nível de transcrição. Como a metilação de promotor pode silenciar um gene tão efetivamente quanto uma mutação na sua seqüência de nucleotídeos, podemos predizer que a metilação desempenha um papel no silenciamento de genes supressores de tumor que ocorre durante a progressão de tumor.

De fato, nos últimos anos, tem-se tornado aparente que a metilação de promotor é tão importante em silenciar genes supressores de tumor quanto o são os vários mecanismos de mutação somática. Mais da metade dos genes supressores de tumor que estão envolvidos em síndromes de câncer familiares por causa de mutação de linhagem germinativa são silenciados em cânceres esporádicos por metilação de promotor. Por exemplo, quando o gene supressor de tumor *Rb* é mutado na linhagem germinativa, isso leva a retinoblastoma familiar. Em retinoblastomas esporádicos, entretanto, esse gene supressor de tumor é inativado ou por mutações somáticas ou por metilação de promotor. Além disso, os promotores de uma variedade de outros genes que inibem (ou se pensa que inibem) a formação de tumor têm sido encontrados em um estado de metilação (Tabela 7.2).

Alguns candidatos a genes supressores de tumor são raramente inativados por mutações somáticas em sua fase de leitura. Como exemplo, o gene *Runx3*, o qual está implicado em desenvolvimento de câncer estomacal, é encontrado em um estado metilado em 45 a 60% desses cânceres, mas virtualmente nunca é inativado por mutação. Situações como essa criam dificuldades para pesquisadores que gostariam de verificar que a inativação de candidatos a genes supressores de tumor contribui para a formação de um ou outro tipo de tumor. No passado, tal validação dependia do encontro de cópias mutantes defectivas de tal gene em genomas de células tumorais. Tais análises genéticas (as quais dependem do seqüenciamento de um alelo de um gene supressor de tumor clonado de um genoma de célula tumoral) não podem mais ser consideradas definitivas, se certos genes supressores de tumor que contribuem para a progressão do tumor são silenciados apenas por metilação do promotor. (De fato, a descoberta de um promotor que é repetidamente metilado no genoma de um grupo de tumores é difícil de interpretar sem ambigüidade; esse achado pode somente refletir o fato de que os tumores estudados surgiram de um tipo normal de célula no qual o gene em questão é metilado como parte de um programa de diferenciação normal.)

Tabela 7.2 Exemplos de genes hipermetilados encontrados em genomas de células tumorais humanas

Nome do gene	Natureza da função protéica	Tipo de tumor
<i>RARβ2</i> <i>p57^{Kip2}</i>	Receptor nuclear para diferenciação Inibidor de CDK	Mama, pulmão Gástrico, pancreático, hepático; AML
<i>TIMP3</i>	Inibidor de metaloproteinases	Tumores diversos
<i>IGFBP</i>	Seqüestra fator IGF-1	Tumores diversos
<i>CDKN2A/p16^{INK4A}</i>	Inibidor de CDK4/6	Tumores diversos
<i>CDKN2B/p15^{INK4B}</i>	Inibidor de CDK4/6	Tumores diversos
<i>p14^{ARF}</i>	Inibidor de HDM2/MDM2	Cólon, linfoma
<i>APC</i>	Indutor de degradação de β-catenina	Carcinomas de cólon
<i>p73</i>	Auxilia p53 a disparar apoptose	Tumores diversos
<i>GSTP1</i>	Inativador de mutagênico	Mama, fígado, próstata
<i>MGMT</i>	Enzima de reparo de DNA	Colorretal
<i>CDH1</i>	Receptor de adesão célula-célula	Bexiga, mama, cólon, gástrico
<i>DAPK</i>	Cinase envolvida em morte celular	Bexiga
<i>MLH1</i>	Enzima de reparo de pareamento incorreto de DNA	Cólon, endometrial, gástrico
<i>TGFBR2</i>	Receptor de TGF-β	Cólon, gástrico, célula pequena de pulmão
<i>THBS1</i>	Inibidor de angiogênese	Cólon, glioblastoma
<i>RB</i>	Regulador de ciclo celular	Retinoblastoma
<i>CASP8</i>	Caspase apoptótica	Neuroblastoma, SCLC
<i>APAF1</i>	Cascata pró-apoptótica	Melanoma
<i>CTMP</i>	Inibidor de Akt/PKB	Glioblastoma multiforme

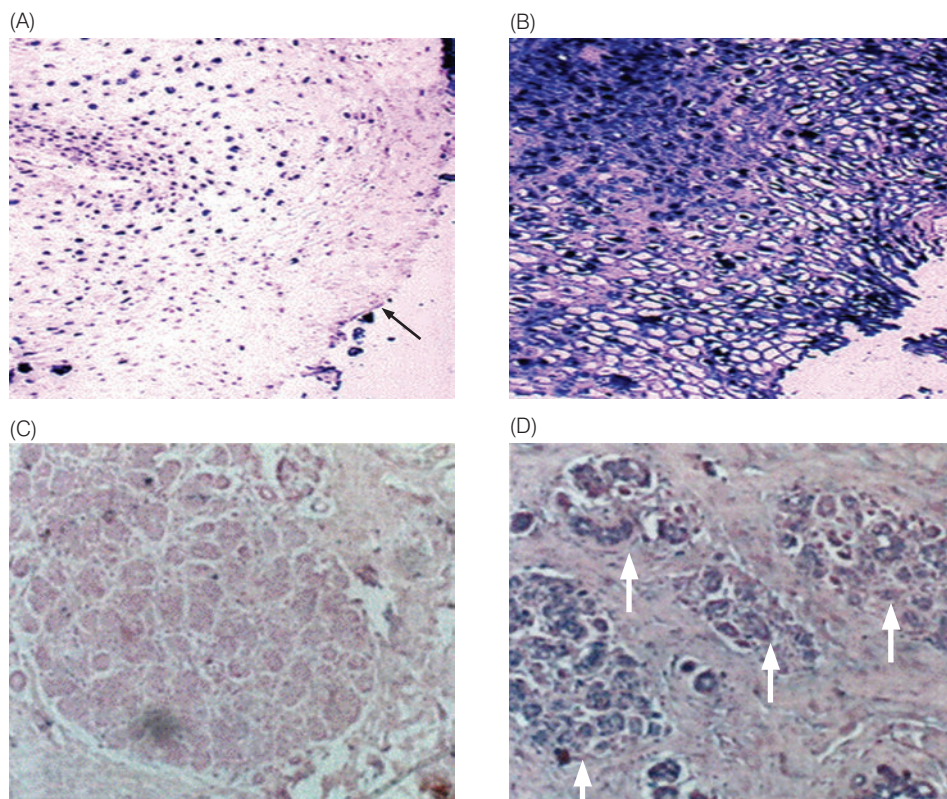
Adaptada, em parte, de C.A. Eads et al., *Cancer Res.* 61:3410-3418, 2001.

A eliminação de função de gene supressor de tumor por metilação de promotor pode, em princípio, ocorrer por duas rotas. Ambas as cópias de um gene supressor de tumor podem ser metiladas independentemente uma da outra. Alternativamente, uma cópia pode ser metilada e a segunda perdida por LOH acompanhada de uma duplicação da cópia do gene supressor de tumor já metilado. Na verdade, esse segundo mecanismo parece ocorrer com bastante frequência. Por exemplo, em um estudo dos epitélios brônquicos normais (grandes brônquios) dos pulmões de fumantes, ex-fumantes e pessoas que nunca fumaram, o gene supressor de tumor *p16^{INK4A}* (a ser descrito na Seção 8.4) estava metilado em 44% das células brônquicas epiteliais cultivadas de fumantes atuais e ex-fumantes, e em nenhuma das células preparadas dos que nunca fumaram. LOH nessa região cromossômica foi encontrada em 71 a 73% das duas populações de fumantes e em 1,5 a 1,7% nos que nunca fumaram.

As observações de que cópias metiladas de genes supressores de tumor frequentemente sofrem perda de heterozigiosidade indicam que o evento de metilação é relativamente pouco frequente por geração celular, na verdade mais raro do que eventos de LOH. (Se metilação sempre ocorresse mais frequentemente do que LOH, tumores mostrariam duas cópias de gene supressor de tumor, uma de origem paterna e outra de origem materna, cada qual metilada independentemente – uma configuração observada com frequência em certos tipos de tumor e raramente em outros tipos.) Claramente, células tumorais evoluindo podem descartar uma segunda cópia ainda funcional do gene supressor de tumor mais prontamente por LOH do que por um segundo evento independente de metilação de promotor.

O estudo descrito anteriormente sobre células epiteliais brônquicas morfológicamente normais também ensina uma segunda lição: a metilação de genes controladores de crescimento críticos ocorre cedo no complexo processo multietapas de formação de tumor, muito antes de mudanças histológicas aparecerem em um tecido. Essas populações de células aparentemente normais presumivelmente provêm um solo fértil para a erupção final de crescimentos pré-malignos e malignos. Esse ponto é trazido à tona também em outros tecidos, como os tecidos histologicamente normais de mama analisados na Figura 7.18.

Figura 7.18 Medições de metilação de DNA *in situ* A presença ou ausência de metilação em sítios específicos no genoma de células pode ser determinada em seções de tecidos fixados a uma lâmina de microscópio usando PCR específico para metilação e hibridização *in situ*. Nestas imagens, o estado de metilação do promotor do gene supressor de tumor *p16^{INK4A}* é analisado com uma sonda específica para metilação, a qual produz cor azul em áreas onde esse promotor está metilado. (A) Em uma lesão intra-epitelial escamosa de baixo grau de cérvix (esquerda), núcleos de células localizadas a alguma distância da superfície uterina mostram metilação de promotor, enquanto aquelas próximas da superfície (*setas*), não. (B) Entretanto, em uma lesão adjacente de alto grau, a qual está pronta para progredir para um carcinoma cervical (*direita*), todas as células mostram metilação de promotor. (C,D) Nestas micrografias de tecido normal de mama, alguns lóbulos histologicamente normais não mostram metilação de promotor, (C) enquanto outros (*setas*) mostram metilação uniforme de promotor (D). Isso sugere que as células do epitélio mamário em tais lóbulos externamente normais já sofreram um passo iniciador crítico para a progressão do câncer. (A,B, de G.J. Nuovo et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:12754-12759, 1999; C,D, de C.R. Holst et al., *Cancer Res.* 63:1596-1601, 2003.)



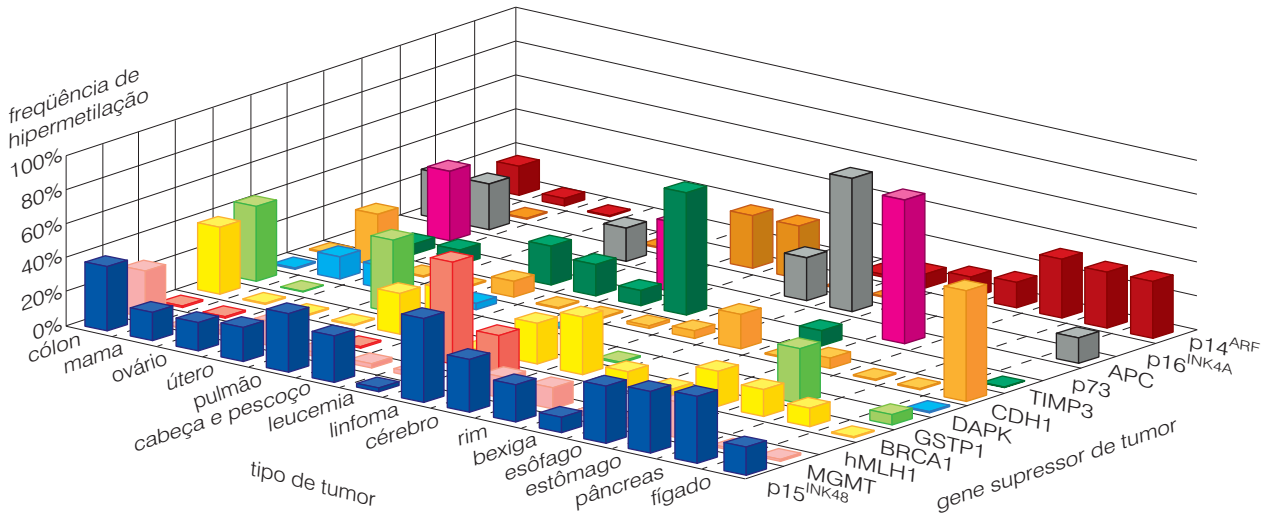


Figura 7.19 Metilação de múltiplos genes em genomas de células tumorais Este gráfico tridimensional de barras resume medições do estado de metilação dos promotores de 12 diferentes genes (*p16^{INK4A}*, *p15^{INK4B}*, *p14^{ARF}*, *p73*, *APC*, *BRCA1*, *hMLH1*, *GSTP1*, *MGMT*, *CDH1*, *TIMP3* e *DAPK*) os quais se sabe ou se pensa que desempenham um papel importante na supressão do desenvolvimento de tumores humanos. O estado de metilação foi determinado pela técnica de PCR específica para metilação. O estado de metilação de cada um desses promotores foi estudado nos DNAs de 15 diferentes tipos de tumor. A altura de cada barra indica a proporção de tumores de um dado tipo em que um promotor específico sofreu metilação. Todos esses promotores são não-metilados (ou metilados a um número insignificante) em tecidos normais. (Adaptada de M. Esteller et al., *Cancer Res.* 61:3225-3229, 2001.)

Ao passo que a formação de tumor prossegue, o silenciamento de genes por metilação de promotor pode também envolver os genes *caretakers* que são responsáveis pela manutenção da integridade das seqüências de DNA no genoma. Um exemplo interessante é provido pelo gene *BRCA1*. Seu produto é responsável pela manutenção do DNA cromossômico por maneiras que são ainda pouco entendidas. A consequência da herança de alelos mutantes de *BRCA1* é uma síndrome de câncer familiar envolvendo um alto risco de câncer de mama durante toda a vida e, menos pronunciado, de carcinomas de ovário (veja a Seção 12.10). Durante um tempo, pensou-se que a inativação de *BRCA1* jamais contribua para cânceres de mama esporádicos, uma vez que alelos mutantes desse gene não podiam ser encontrados nesta segunda, e bem mais comum, classe de tumores mamários. Agora sabemos que 10 a 15% dos carcinomas esporádicos de mama carregam cópias inativas do gene *BRCA1* silenciadas por metilação de promotor.

A Figura 7.19 ilustra o estado de metilação dos promotores de 12 genes em uma variedade de tipos de tumores humanos. Essa figura claramente demonstra que a frequência de metilação de um gene específico varia dramaticamente de um tipo de tumor para outro. Os dados nela reforçam o ponto de que genes supressores de tumor, bem como genes *caretakers*, sofrem hipermetilação. Talvez a lição mais importante dessa figura seja a grande existência de metilação de promotores durante o desenvolvimento de uma larga variedade de cânceres humanos.

Em um dado tumor, múltiplos genes parecem ser desligados por metilação de promotor. Por exemplo, em uma análise do estado de metilação de oito genes críticos relacionados com câncer nos genomas de 107 carcinomas pulmonares de célula não-pequena (NSCLCs), 37% tinham pelo menos um desses promotores gênicos metilados, 22% tinham dois promotores metilados e 2% carregavam cinco dos oito promotores em um estado metilado. A decisão de analisar estes genes em particular envolveu, por necessidade, algumas escolhas arbitrárias, e podemos imaginar que houve dúzias de outros genes hipermetilados nesses genomas de células cancerosas cuja inativação contribuiu de várias maneiras para formação de câncer.

As consequências fisiológicas celulares de metilação de promotor são facilmente ilustradas pelas ações do ácido retinóico em células epiteliais normais e neoplásicas. Em muitas células epiteliais, o ácido retinóico é um potente indutor de parada no ciclo celular e mesmo na diferenciação. Ele tem sido usado, por exemplo, em tentativas para interromper a proliferação de células de mama cancerosas. Todavia, a grande maioria dessas células de câncer silenciou, por metilação de promotor, o gene *RARβ2*, o qual codifica um receptor importante de ácido retinóico. Sem a expressão desse receptor, as células de câncer de mama não respondem ao tratamento com ácido retinóico, evitando a interrupção de crescimento e continuando a se multiplicar com sucesso na presença deste agente.

Como descrito anteriormente, a metilação de CpGs em promotores age para atrair moléculas de histona desacetilase (HDAC), as quais procedem para reconfigurar proteínas da cromatina próximas, colocando-as em um estado incompatível com a transcrição. O uso de um inibidor de HDACs, chamado tricostatina A (TSA), reverte essa desacetilação, causando assim reversão da cromatina para um estado que permite transcrição. Portanto, o tratamento de células de câncer de mama com TSA causa reativação de expressão gênica de RAR β 2 e restabelece sua responsividade aos efeitos inibitórios de crescimento do ácido retinóico. Esse resultado mostra claramente que a metilação de promotor age via desacetilação de histonas para promover câncer. Ao mesmo tempo, ele sugere uma terapia para carcinomas de mama pelo tratamento concomitante com tricostatina A e ácido retinóico.

7.9 Genes supressores de tumor e proteínas funcionam de diversas maneiras

Vimos que os genes supressores de tumor e suas proteínas codificadas agem por diversos mecanismos para bloquear o desenvolvimento de câncer. Na verdade, a única característica que relaciona esses genes e suas proteínas codificadas é o fato de que todos eles operam para reduzir a probabilidade de desenvolvimento de câncer. Um exame cuidadoso da lista de genes supressores de tumor clonados (veja a Tabela 7.1) revela que alguns deles funcionam para suprimir diretamente a proliferação de células em resposta a uma variedade de sinais inibidores de crescimento e indutores de diferenciação. Ainda outros são componentes do circuito de controle celular que inibe proliferação em resposta a desequilíbrio metabólico e dano genômico.

Os primeiros dois genes supressores de tumor intensivamente estudados, o *Rb*, discutido anteriormente neste capítulo, e um segundo gene supressor de tumor, chamado de *p53*, *Tip53* ou *TP53*, também são os genes supressores de tumor que desempenham papéis mais importantes na patogênese de cânceres humanos. A proteína codificada pelo gene *Rb* governa o progresso de uma variedade de células por meio de seus ciclos de crescimento e divisão; e o controle de crescimento imposto pelo circuito *Rb* parece ser perdido na maioria, talvez em todos, os tumores humanos. Pela sua função centralmente importante, devotamos um capítulo inteiro à discussão de *Rb* e, assim, retardaremos a discussão deste gene e sua proteína codificada até o Capítulo 8. O gene supressor de tumor *p53* desempenha um papel igualmente central no desenvolvimento de cânceres, e a rota que seu produto, p53, controla, também parece estar desativada em virtualmente todos os tipos de cânceres humanos. Este gene supressor de tumor e sua proteína merecem uma discussão igualmente extensa, e por consequência, devotaremos a maior parte do Capítulo 9 a uma detalhada descrição da função de p53 e o programa de morte celular que ela controla.

Os genes supressores de tumor restantes que têm sido enumerados até agora despacham produtos gênicos para uma variedade de sítios intracelulares, nos quais eles operam de diversas maneiras para suprimir a proliferação celular. Essas proteínas interferem em virtualmente todos os circuitos de controle responsáveis por governar proliferação celular e sobrevivência. Muitas das proteínas codificadas pelos genes supressores de tumor listados na Tabela 7.1 são componentes das rotas de *Rb* e *p53*; incluídos nesses circuitos estão os genes *p16^{INK4A}*, *p15^{INK4B}* e *p19^{ARF}*, e, portanto, a discussão destes será adiada até os Capítulos 8 e 9.

Os mecanismos de ação de alguns dos genes supressores de tumor na Tabela 7.1 estão razoavelmente bem-entendidos até agora, enquanto as ações de outros listados nessa mesma tabela permanecem bastante obscuras. Enfocaremos, agora, em profundidade três desses genes supressores de tumor para ilustrar os mecanismos de ação muito interessantes de seus produtos. Esses exemplos – realmente incríveis – foram escolhidos da ampla lista mostrada na Tabela 7.1 porque revelam o quão diversos são os mecanismos que as células usam para prevenir a proliferação descontrolada. Eles também ilustram as dificuldades encontradas na determinação de específicas ações bioquímicas e biológicas de várias proteínas codificadas por genes supressores de tumor. Vamos da superfície celular para dentro.

7.10 A proteína NF1 age como um regulador negativo da sinalização da Ras

A doença neurofibromatose foi descrita pela primeira vez por Friedrich von Recklinghausen, em 1862. Agora sabemos que a neurofibromatose tipo 1 (às vezes chamada neurofibromatose de Recklinghausen) é uma síndrome de câncer familiar relativamente comum, com uma média global de um indivíduo afetado em cada 3.500. A característica primária dessa doença é o desenvolvimento de tumores benignos das bainhas celulares ao redor de nervos no sistema nervoso periférico. Ocasionalmente, uma subclasse desses **neurofibromas** progride para tumores malignos chamados **neurofibrossarcomas**. Pacientes que sofrem de neurofibromatose tipo 1 também têm risco muito aumentado de glioblastomas (tumores da linhagem de astrócitos no cérebro; veja a Figura 2.9A), **feocromocitomas** (surgidos das glândulas adrenais) e leucemias mielógenas (veja a Figura 2.8B). Esses tumores envolvem tipos celulares surgidos de diversas linhagens embriogênicas.

Pacientes de neurofibromatose freqüentemente sofrem de anormalidades adicionais que envolvem ainda outros tipos celulares. Entre estas estão **pontos de “café com leite”**, os quais são áreas de hiperpigmentação na pele; alterações súbitas na morfologia das células da pele e de ossos longos; déficits cognitivos; lesões benignas da íris chamadas “nódulos de Lisch” (Figura 7.20). Tais manifestações são muito influenciadas pelo **embasamento genético** dos pais (i. e., o arranjo de todos os outros alelos gênicos no genoma de um indivíduo), uma vez que irmãos herdando o mesmo alelo mutante do gene responsável, chamado *NF1*, com freqüência exibem fenótipos muito diferentes da doença.

O gene *NF1* foi clonado em 1990. (Um segundo tipo de neurofibromatose está conectado com inativação de um gene supressor de tumor completamente não-relacionado.) O comportamento genético do gene *NF1* assemelha-se intimamente com o do gene *Rb*. Assim,

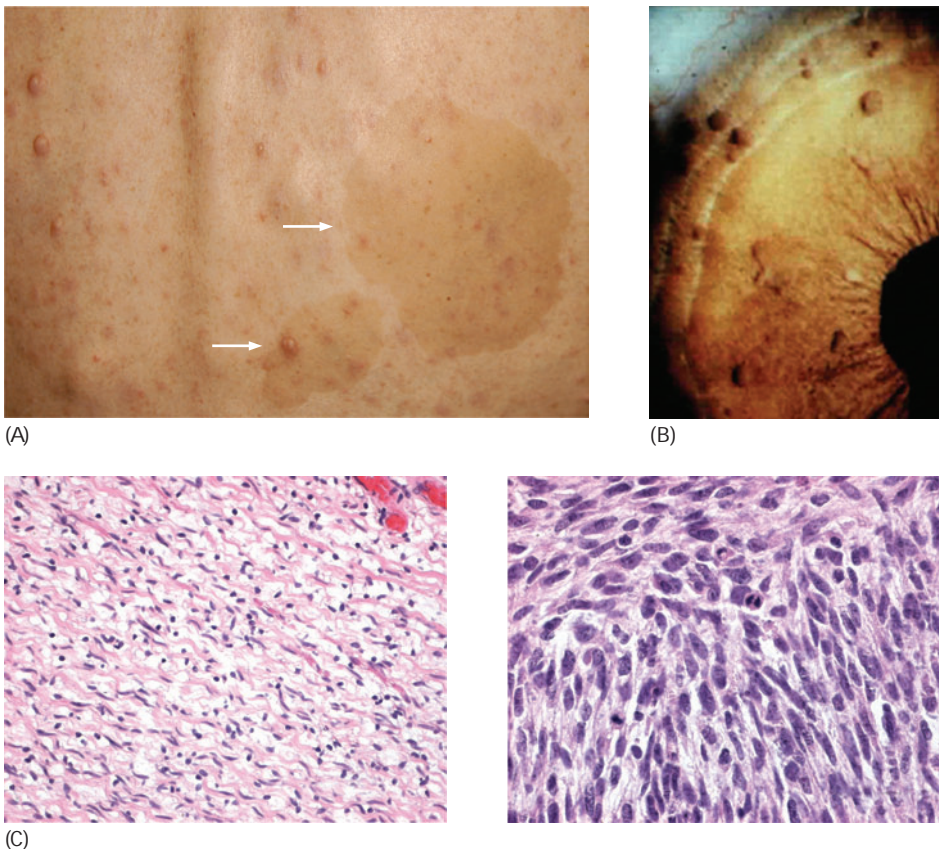


Figura 7.20 Neurofibromatose

Neurofibromatose tipo 1 é considerada uma síndrome porque um número de distintas condições está associado a um único estado genético. (A) Notáveis entre estas estão os numerosos pequenos nódulos subcutâneos (i. e., neurofibromas) e os pontos cor de café com leite (setas) vistos aqui nas costas do paciente. (B) Além disso, nódulos de Lisch são freqüentemente observados na íris dos olhos desses pacientes. (C) Observações histológicas de tecidos afetados indicam os neurofibromas benignos (*esquerda*), o quais ocasionalmente progridem para tumores malignos da bainha de nervos periféricos (MPNSTs, *direita*). A complexidade histológica dos neurofibromas dificultou muito a identificação dos seus precursores normais que agora se acredita que sejam as células de Schwann que rodeiam axônios periféricos. (A e C, cortesia de B.R. Korf; B, de B.R. Korf, *Postgrad. Med.* 83:79-88, 1988.)

alelos mutantes desativados do gene *NF1* transmitidos através da linhagem germinativa agem de uma maneira dominante para criar fenótipos doentes. Ao nível celular, a configuração originalmente heterozigótica do gene (*NF1*^{+/−}) é convertida em um estado homozigótico (*NF1*^{−/−}) em células tumorais por perda de heterozigosidade. Finalmente, 50% dos pacientes de neurofibromatose não têm um histórico familiar da doença, indicando que o alelo mutante que carregam é consequência de uma mutação *de novo* na linhagem germinativa. Como no caso do gene *Rb*, mutações *de novo* geralmente ocorrem durante espermatogênese nos pais de pacientes afetados.

Uma vez que o gene foi sequenciado, tornou-se possível associar uma função para neurofibromina, a proteína codificada pelo gene *NF1*: ela mostrou extensa correlação de sequência com uma proteína de *Saccharomyces cerevisiae* (levedura), denominada IRA, que funciona como uma proteína ativadora de GTPase (GAP) para Ras, bem como para duas proteínas Ras-GAP de mamíferos. Como a maioria, se não todos os eucariotos, as células de leveduras usam proteínas Ras para regular importantes aspectos de seu metabolismo e proliferação. Análises genéticas detalhadas já mostraram que, em levedura, as funções positivas de sinalização da proteína Ras são desempenhadas pela proteína IRA. Provocando a ativação da atividade intrínseca de GTPase da Ras, IRA força Ras a converter-se de sua forma ativada ligada a GTP para sua forma inativa ligada a GDP; precisamente a mesma função é desempenhada pelas proteínas Ras-GAP de mamíferos. Na verdade, uma Ras-GAP pode emboscar Ras ativada antes de esta ter tido a chance de estimular sua trupe de efetores *downstream* (Seção 5.9, Barra lateral 5.11).

Essa visão inicial da função de NF1 inspirou um esquema simples de como formas defeituosas de NF1 criam fenótipos doentes. NF1 é muito expressa ao longo do corpo, em níveis especialmente altos nos sistemas nervosos centrais e periféricos de adultos. Quando células são estimuladas por fator de crescimento pela primeira vez, elas podem degradar NF1, capacitando a sinalização por Ras a proceder sem interferência da primeira. Entretanto, após 60 a 90 minutos, níveis de NF1 voltam ao normal, e a proteína que se acumula ajuda a interromper a sinalização por Ras – uma forma de controle por retroalimentação negativa. Em células neuroectodermas sem função de NF1, acredita-se que proteínas Ras existam em seu estado ativado, ligadas a GTP, por períodos maiores do que o normal. De fato, nas células de neurofibromas, que são geneticamente *NF1*^{−/−}, níveis elevados de Ras ativada e proteínas efetoras da Ras podem ser encontrados (Figura 7.21). Conseqüentemente, a perda de função de NF1 em uma célula pode mimetizar funcionalmente as proteínas Ras ativadas que são criadas pelos oncogenes mutantes *ras* (veja a Seção 5.9).

A complexidade histológica de neurofibromas tem tornado difícil identificar o tipo celular normal que produz a maioria das células nesses crescimentos. Análises microscópicas (veja a Figura 7.20) revelam que esses crescimentos são compostos de uma mistura de tipos celulares, incluindo células de Schwann (as quais envolvem e isolam axônios nervosos), neurônios, células perineurais (que parecem ser de origem fibroblástica e são encontradas ao redor de neurônios), fibroblastos e mastócitos, os últimos vindos do sistema imunológico. Em alguns desses tumores benignos, células de Schwann são claramente o tipo celular que prevalece, enquanto em outros parece que fibroblastos ou células perineurais podem dominar.

O peso das evidências indica que os precursores das células de Schwann são os alvos primários de LOH em neurofibromas, e que uma vez que as células de Schwann perdem toda a função de NF1, elas orquestram o desenvolvimento desses crescimentos histologicamente complexos pela indução de co-proliferação de uma variedade de outros tipos celulares via sinalização parácrina. Essa co-proliferação levanta uma questão interessante e ainda não-respondida, no entanto: já que esses outros tipos celulares vizinhos têm um genótipo *NF1*^{+/−}, poderiam ser eles mais suscetíveis a sinais estimulatórios de crescimento do que células totalmente tipo selvagem? Tal suscetibilidade aumentada poderia surgir do fato de que tais células carregam somente metade da dose normal de proteína NF1 funcional.

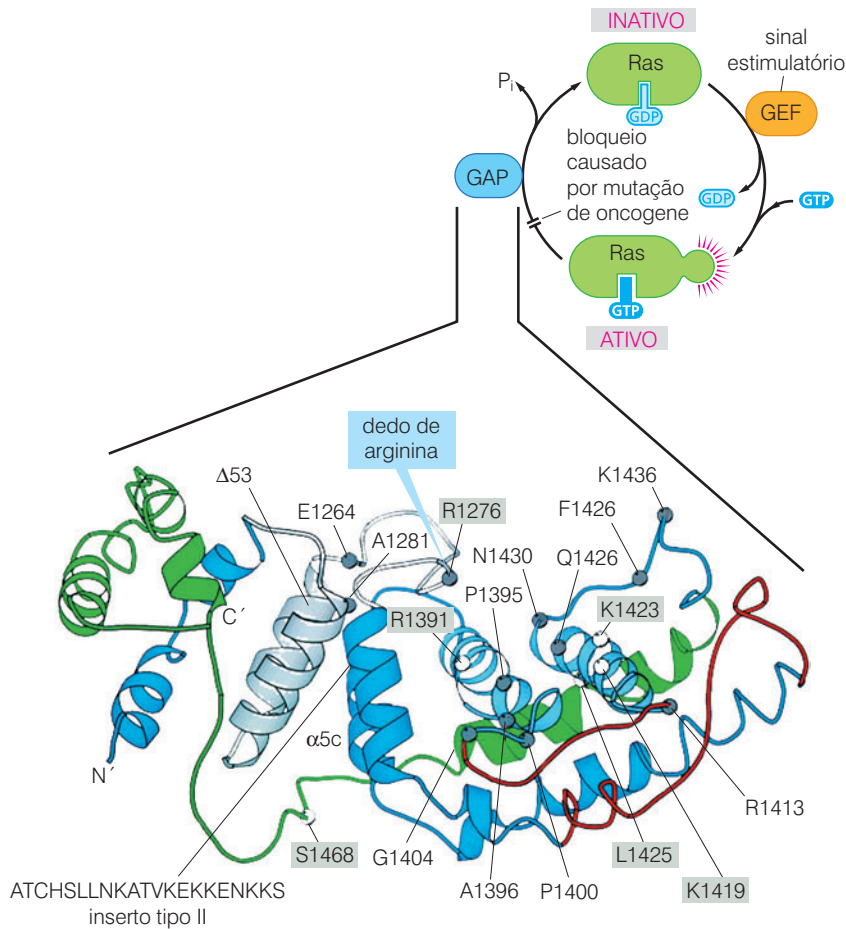


Figura 7.21 Neurofibromina e o ciclo de sinalização da Ras. Como ilustrado na Figura 5.30, a proteína Ras passa por um ciclo no qual ela se torna ativada por um fator de troca de nucleotídeo de guanina (GEF), tal como Sos, e inativa por uma proteína ativadora de GTPase (uma Ras-GAP). Uma das principais Ras-GAPs é a neurofibromina (NF1), produto do gene *NF1*. A interação de Ras com NF1 pode aumentar a atividade de GTPase da Ras mais de mil vezes. A estrutura do domínio de NF1 que interage com Ras é ilustrada aqui. Um subdomínio de NF1 chamado de "dedo de arginina" (acima) carrega uma arginina crítica (R1276) que está inserida na fenda GTPase da Ras e contribui ativamente para a hidrólise de GTP a GDP pela Ras. Formas mutantes de NF1 (carregando substituições de aminoácidos) observadas em pacientes com neurofibromatose estão indicadas por esferas verde-claro que estão marcadas por caixas verdes; mutações criadas experimentalmente também geraram um número de substituições de aminoácidos (esferas verde-escuro) que também comprometem a função GAP de NF1. Além disso, uma deleção de larga escala ($\Delta 53$) e uma inserção ("inserto tipo II") encontradas em pacientes são mostradas; ambas são associadas à doença. (De K. Scheffzek et al., EMBO J. 17:4313-4327, 1998.)

Aqui está uma indicação de que uma dose metade da normal de proteína NF1 pode, sim, afetar células e, assim, o fenótipo do organismo: mastócitos (um tipo de célula imune) em camundongos que expressam um receptor de fator de crescimento Kit defeituoso são produzidos em números anormalmente baixos, uma indicação do importante papel de Kit na promoção de proliferação dessas células imunes. Todavia, o genótipo *Nf1*^{+/-}, quando presente nos precursores de mastócitos que possuem o receptor Kit parcialmente defeituoso, resulta em uma reversão substancial do fenótipo (i. e., uma normalização do número de mastócitos), indicando (1) que NF1 opera para enfraquecer o sinal do receptor Kit, entre outras proteínas; e (2) que a sinalização inadequada do receptor Kit pode ser compensada pela sinalização aumentada da Ras, resultante da perda parcial de função NF1. Em um sentido mais amplo, a presença da proteína NF1 em concentrações metade da normal em muitos tipos de células provavelmente resulta em um aumento substancial da sinalização de Ras e, assim, afeta os fenótipos das células.

Essas observações levantam uma questão mais geral sobre genes supressores de tumor: dado que as mudanças fenotípicas completas da inativação de genes supressores de tumor (TSG) são sentidas apenas quando ambas as cópias são perdidas, poderia, entretanto, ser o caso de que meia dose de suas proteínas codificadas (o que é frequentemente observado em células com um genótipo *TSG*^{+/-}) produz mudanças súbitas, porém bem reais, no comportamento celular – o fenômeno genético de **haploinsuficiência** (Barra lateral 7.6)?

7.11 Apc facilita egresso de células de criptas do cólon

Enquanto a grande maioria (95%) de cânceres de cólon parece ser esporádica, um pequeno grupo surge como uma consequência de alelos herdados que criam risco substancial dessa

Barra lateral 7.6 Haploinsuficiência: quando meia dose não é muito melhor do que nada O paradigma de Knudson de inativação de genes supressores de tumor postula que alelos mutantes de genes supressores de tumor são recessivos ao nível celular. Assim, células heterozigotas para um gene supressor de tumor (i. e., $TSG^{+/-}$) deveriam ser fenotipicamente normais. Porém existem razões bioquímicas perfeitamente boas para pensar que células expressando metade do nível normal de uma proteína de um gene supressor de tumor podem ter um fenótipo que desvia significativamente do selvagem, e, na verdade, exemplos disso têm sido observados além dos citados no texto.

No caso de gene *Rb*, evidência substancial indica que células $Rb^{+/-}$ são fenotipicamente normais. Assim, quaisquer patologias mostradas por heterozigotos humanos são limitadas a populações de células que perderam a cópia selvagem do gene *Rb*, geralmente por LOH, e são, portanto, $Rb^{-/-}$; os tecidos $Rb^{+/-}$ remanescentes ao longo do corpo parecem desenvolver-se normalmente e exibir funções normais.

Observações de camundongos alterados geneticamente, no entanto, provêem exemplos claros de haploinsuficiência. Camundon-

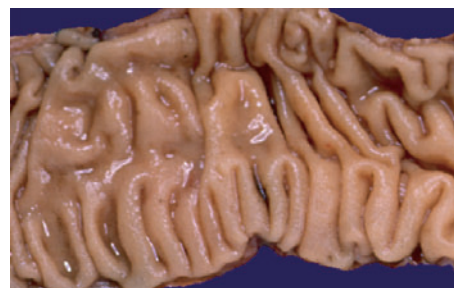
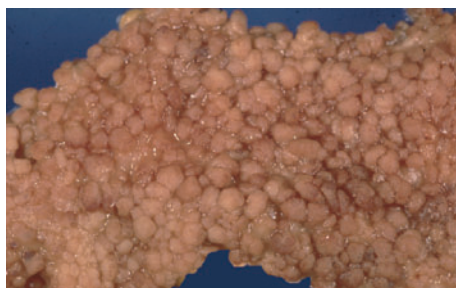
gos carregando somente uma cópia do gene que codifica o fator de transcrição Smad4, usado por TGF- β para inibir proliferação celular (como veremos na Seção 8.10), são predispostos a desenvolver pólipos no estômago e no intestino delgado, e as células nesses tumores continuam a carregar cópias únicas do alelo tipo selvagem desse gene. Camundongos heterozigotos para o gene supressor de tumor $p27^{Kip1}$ são similarmente suscetíveis a tumor, sem indicação de LOH em células tumorais; esse gene codifica um importante inibidor de progressão de ciclo celular (Seção 8.4). Um terceiro exemplo é provido por camundongos heterozigotos para o gene que codifica a proteína supressora de tumor PTEN (Seção 6.6), em que uma clara aceleração de tumorigênese de câncer de próstata é criada pela ausência de uma única cópia desse TSG. Finalmente, a deleção de uma cópia do gene *Dmp1*, o qual codifica um fator de transcrição que induz a expressão de TSG $p19^{ARF}$, leva novamente à suscetibilidade aumentada a tumor sem perda da cópia tipo selvagem do gene em células tumorais. Ao todo, pelo menos meia dúzia de TSGs humanos produzem fenótipos celulares anormais quando uma única cópia do gene tipo selvagem está presente no genoma das células.

doença por toda a vida. A mais compreendida dessas síndromes herdáveis de câncer de cólon é a polipose adenomatosa, geralmente chamada polipose adenomatosa familiar (FAP), isto é, uma suscetibilidade herdada a desenvolver pólipos adenomatosos no cólon. Tais pólipos (não-malignos), sozinhos, são suscetíveis a desenvolver carcinomas a uma frequência baixa mas previsível. Esta síndrome é responsável por um pouco menos de 1% de todos os cânceres de cólon no ocidente.

Nos cólons de populações ocidentais, nas quais o câncer de cólon é relativamente freqüente por fatores dietéticos ainda pouco entendidos, pólipos são, com frequência, encontrados em baixos números espalhados ao longo do cólon. Aos 70 anos, até metade dos indivíduos dessas populações desenvolveu pelo menos um desses crescimentos (veja, p. ex., a Figura 2.15A). Não obstante, nos relativamente raros indivíduos sofrendo de polipose adenomatosa familiar, centenas de pólipos formam um tapete na superfície luminal do cólon, isto é, a superfície do cólon que está voltada para a cavidade intestinal.

A clonagem do gene APC (Barra lateral 7.7) levou, após muitos anos de pesquisa adicional, a uma visão razoavelmente clara de como ele e sua proteína codificada são capazes de controlar proliferação celular no cólon. Como discutiremos em maiores detalhes em capítulos posteriores, os epitélios do cólon e do duodeno são organizados de uma maneira que é típica de diversos epitélios ao longo do corpo. Em todos os casos, grupos de células-tronco relativamente indiferenciadas geram duas células-filha distintas quando se dividem: uma filha permanece como célula-tronco, assegurando assim que o número de células-tronco permaneça

Figura 7.22 Polipose adenomatosa familiar A parede do cólon de um indivíduo afetado com polipose adenomatosa familiar (FAP) é forrada com centenas de pequenos pólipos (*esquerda*); tais pólipos são ausentes na parede lisa de cólons normais (*direita*). A estrutura detalhada de um tipo de pólipo colônico é mostrada na Figura 2.15A. (Cortesia de A. Wyllie e M. Arends.)



Barra lateral 7.7 Populações humanas especiais facilitam a detecção de síndromes herdáveis de câncer e o isolamento de genes responsáveis. Os mórmons no estado de Utah representam uma população que provê uma ótima oportunidade a geneticistas humanos para entender a genética de vários tipos de doenças herdáveis humanas. Uma proporção substancial de indivíduos na população atual de mórmons em Utah pode rastrear seus ancestrais até um grupo relativamente pequeno de fundadores pioneiros que chegaram em Utah na metade do século XIX. Casais de mórmons têm tido tradicionalmente um número grande de filhos e têm-se reproduzido relativamente cedo, levando a grandes famílias multigeracionais – objeto ideal de pesquisa genética.

Mais importante, um dogma da religião dos mórmons é uma crença no batismo retroativo de indivíduos ancestrais dos de hoje. Como consequência, a igreja Mórmon (mais apropriadamente, a Igreja de Jesus Cristo dos Santos dos Últimos Dias) tem encorajado seus membros a praticar extensiva pesquisa genealógica. Para facilitar tal pesquisa, a igreja estabeleceu e mantém o maior arquivo ge-

nealógico do mundo na cidade de Salt Lake, Utah. Finalmente, os mórmons em Utah têm sido particularmente receptivos em ajudar geneticistas humanos a traçar genes para suscetibilidade a doenças específicas por seus pedigrees.

A confluência desses fatores tornou possível montar pedigrees multigeracionais, como o mostrado na Figura 7.23; estes têm capacitado geneticistas a rastrear com precisão como o alelo mutante de um gene predispondo uma pessoa a polipose adenomatosa familiar é transmitido através de múltiplas gerações de uma família e como ele opera de maneira dominante para criar suscetibilidade a pólipos de cólon e resultar em risco aumentado de câncer de cólon. O uso de análise de ligação, na qual a transmissão genética desse alelo de predisposição estava conectada a marcadores genéticos anônimos em vários cromossomos humanos, também revelou que esse alelo era repetidamente co-transmitido de uma geração para a próxima com marcadores genéticos no braço curto do cromossomo 5 humano. Essa localização, junto com análises de LOH, por fim tornaram possível a clonagem molecular do gene *APC*, em 1991.

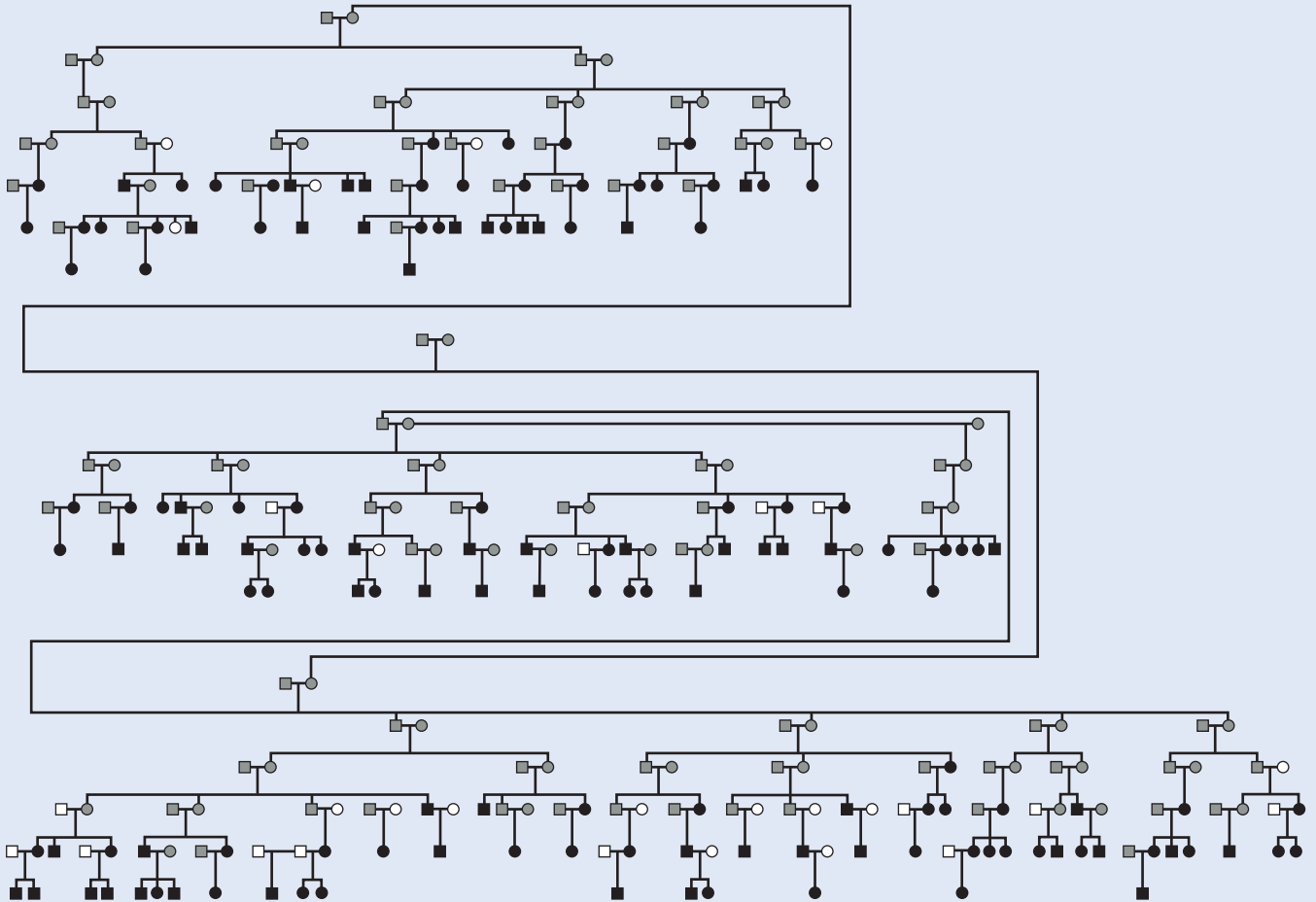


Figura 7.23 Mapeamento genético usando grandes famílias. A habilidade de analisar os genomas de um grande número de indivíduos em uma família afetada com uma suscetibilidade congênita à síndrome de câncer, como polipose adenomatosa familiar, facilita muito a localização do gene responsável em uma pequena região de um cromossomo humano. No caso do gene *Apc*, a disponibilidade de uma grande família mórmon afetada com

polipose adenomatosa familiar, cujas relações foram traçadas pelos extensivos arquivos genealógicos guardados na cidade de Salt Lake, Utah, facilitou a localização desse gene em uma região pequena do braço curto do cromossomo humano 5. Indivíduos afetados estão indicados por símbolos preenchidos. (Cortesia de R.L. White, M.F. Leppert e R.W. Burt.)

constante em um tecido; entretanto, a outra filha e suas descendentes tornam-se comprometidas a se diferenciar.

No intestino delgado, algumas dessas células epiteliais diferenciadas participam da absorção de nutrientes do lúmen e da transferência desses nutrientes para a circulação; no cólon, elas podem absorver água do lúmen. Ainda outras células epiteliais especializadas secretam um material semelhante a muco que ajuda a proteger o epitélio do cólon de conteúdos do lúmen. (No trato gastrointestinal, essas várias células epiteliais são chamadas **enterócitos**.)

As localizações das células-tronco e de células mais diferenciadas no cólon estão ilustradas na Figura 7.24A. Note que as células-tronco são protegidas por sua localização no fundo de

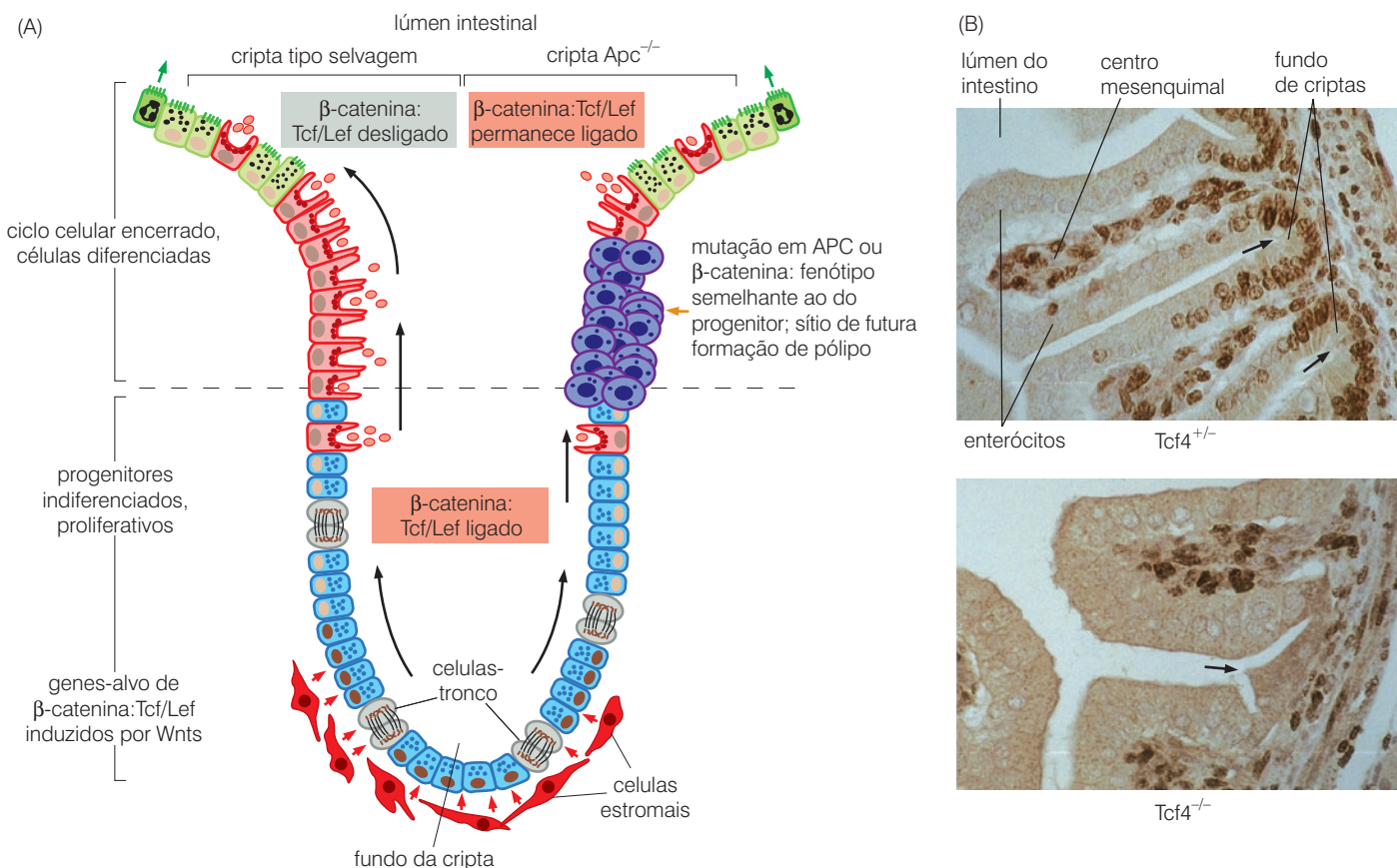


Figura 7.24 β-catenina e a biologia das criptas do cólon (A) A cripta do cólon contém células-tronco em replicação perto do fundo, as quais contêm altos níveis de β-catenina (setas vermelhas pequenas). Nas células localizadas próximas do fundo da cripta, níveis de β-catenina intracelular estão altos porque elas estão recebendo sinais Wnt do estroma (vermelho; veja a Seção 6.10). Essas moléculas de β-catenina migram para o núcleo e se associam a fatores de transcrição Tcf/Lef, os quais promovem proliferação aumentada dessas células e previnem sua diferenciação. No intestino normal, grande parte da prole dessas células-tronco migra para cima na direção do lúmen (lado esquerdo da cripta). Quando elas fazem isso, a estimulação por Wnts diminui; isso leva à aumentada degradação de β-catenina, o que resulta, por sua vez, na cessação de proliferação e na aumentada diferenciação ao passo que as células aproximam-se do lúmen e, por fim, entram em apoptose, após 3 a 4 dias (setas verdes pequenas). Em contraste, quando a proteína Apc é defeituosa, níveis de β-catenina permanecem altos (lado direito da cripta) mesmo na ausência de intensa sinalização por Wnt, e células ainda não

diferenciadas, proliferativas (púrpura), falham em migrar, acumulam-se dentro da cripta e por fim geram um pólipo adenomatoso. (B) A formação do compartimento perto do fundo das criptas depende criticamente do alto nível de β-catenina normalmente encontrado em células-tronco e de sua habilidade em se associar com a proteína Tcf4 para formar um fator de transcrição ativo. Como visto nessa figura, células epiteliais no fundo das criptas de camundongos *Tcf4*^{+/+} (setas, painel superior) são altamente proliferativas, como evidenciado pela coloração com Ki67, um marcador de proliferação celular. Quando elas se movem para fora da cripta acima dos lados das vilosidades, perdem potencial proliferativo. (As células mesenquimais no centro de cada vilosidade são também altamente proliferativas, mas seu comportamento não está relacionado àquele dos enterócitos epiteliais.) Em camundongos *Tcf4*^{-/-} (painel inferior), em contraste, as células-tronco dos enterócitos nas criptas estão ausentes (seta) e todo o intestino, portanto, fica sem uma camada epitelial. (A, de M. van de Wetering et al., *Cell* 111:251-263, 2002; B, de V. Korinek et al., *Nat. Genet.* 19:379-383, 1998.)

profundas cavidades conhecidas como **criptas**. Enquanto parte da prole dessas células fica para trás nas criptas para manter um número constante de células-tronco, a maioria é dispersa para fora da cripta na direção da superfície luminal do epitélio, onde elas funcionarão brevemente para formar o alinhamento epitelial do intestino, morrerão por apoptose e serão descartadas no lúmen do cólon. Todo esse processo de migração e morte leva apenas 3 a 4 dias.

O esquema mostrado na Figura 7.24A representa um mecanismo de defesa muito efetivo contra o desenvolvimento de câncer de cólon, uma vez que quase todas as células que sofreram mutações no dever de proteção da parede do cólon são condenadas a morrer dentro de dias depois de formadas. Por essa lógica, o único tipo de mutação que pode levar subsequente ao desenvolvimento de um câncer será o daquelas mutações (e alelos mutante resultantes) que bloqueiam ambos os eventos, de migração de células epiteliais do cólon a partir das criptas e de morte celular, que ocorre logo após. Se um enterócito do cólon adquire uma mutação que causa sua retenção e sobrevivência em uma cripta, essa célula e suas descendentes podem se acumular na cripta, e quaisquer alelos mutantes adicionais adquiridos subsequentemente por sua progênie serão similarmente retidos nas criptas, em vez de serem rapidamente perdidos por apoptose dessas células descendentes. Tais mutações adicionais podem incluir, por exemplo, genes que empurram a progênie para um estado de crescimento neoplásico.

Essas dinâmicas estão focadas no mecanismo molecular que controla a migração de enterócitos da cripta do cólon. β -catenina é a governadora de grande parte desse comportamento. Lembremos da Seção 6.10: os níveis de β -catenina solúvel no citoplasma são controlados por fatores de crescimento Wnt. Quando Wnts ligam-se a receptores da superfície celular, β -catenina é preservada da destruição, se acumula e migra para o núcleo, onde se liga a um grupo de proteínas ligadoras de DNA chamadas genericamente de Tcf ou Lef. O fator heterodimérico de transcrição resultante procede para atrair ainda outras proteínas nucleares, formando complexos multiprotéicos que ativam a expressão de uma série de genes-alvo, programando (no caso de enterócitos) o fenótipo de célula-tronco.

No contexto da cripta do cólon, células-tronco enterocíticas encontram fatores Wnt liberados por células estromais perto do fundo da cripta, os quais mantêm altos os níveis de β -catenina nos enterócitos (veja a Figura 7.24). Na verdade, essas células são mantidas em um estado semelhante ao de célula-tronco pelo alto nível de β -catenina intracelular. Entretanto, quando parte da progênie dessas células-tronco começa sua migração, ela não mais experimenta sinalização por Wnt, e níveis de β -catenina intracelular caem precipitadamente. Como consequência, essas células perdem seu fenótipo de célula-tronco, saem do ciclo celular e diferenciam-se em enterócitos funcionais.

Apc, o produto do gene da polipose adenomatosa do cólon, é responsável pelo controle negativo dos níveis de β -catenina no citosol. Nas células do fundo de criptas normais, o gene *APC* não é expresso em níveis detectáveis, e β -catenina está presente em altos níveis. Todavia, quando células começam sua migração para fora da cripta, os níveis de expressão de Apc nestas células aumentam muito, e, na ausência de Wnts, a Apc baixa os níveis intracelulares de β -catenina.

Essa expressão invertida é explicada facilmente pelo conhecido mecanismo molecular de ação de Apc, uma grande proteína de 2.843 aminoácidos (Figura 7.25A). Juntamente com duas proteínas de sustentação, axina e conductina, Apc forma um complexo multiprotéico que une glicogênio sintase cinase-3 β (GSK-3 β) e β -catenina (Figura 7.25B). Essa associação capacita GSK-3 β a fosforilar quatro resíduos aminoterminais de β -catenina; a fosforilação então leva à degradação de β -catenina pela via ubiquitina-proteossoma (Barra lateral 7.8). Em suma, Apc é essencial para disparar a degradação de β -catenina e, na sua ausência, altos níveis de β -catenina acumulam nas células.

Com essa informação em mente, podemos colocar a inativação do gene *APC* no contexto da biologia das criptas do cólon. Quando o espectro de mutações de *APC* encontrado em cânceres de cólon humanos é catalogado (veja a Figura 7.25), é possível ver muitas mutações que causam término prematuro de tradução da proteína Apc, assim removendo domínios que são importantes para sua habilidade de associar-se a β -catenina e axina para resultante degradação de β -catenina.

O acúmulo de β -catenina é claramente a mais importante consequência da inativação de *APC*, a qual pode ser observada em cerca de 90% dos carcinomas esporádicos de cólon. É possível chegar a essa conclusão a partir do estudo da minoria restante (cerca de 10%) de carcinomas esporádicos que carregam alelos *APC* tipo selvagem. Em alguns casos, o promotor do gene *APC* está hipermetilado e, assim, inativo. Em outros, o gene de β -catenina carrega mutações pontuais, e as moléculas mutantes de β -catenina perdem os resíduos de aminoácidos normalmente fosforilados por GSK-3 β . Como não podem ser fosforiladas, nas molé-

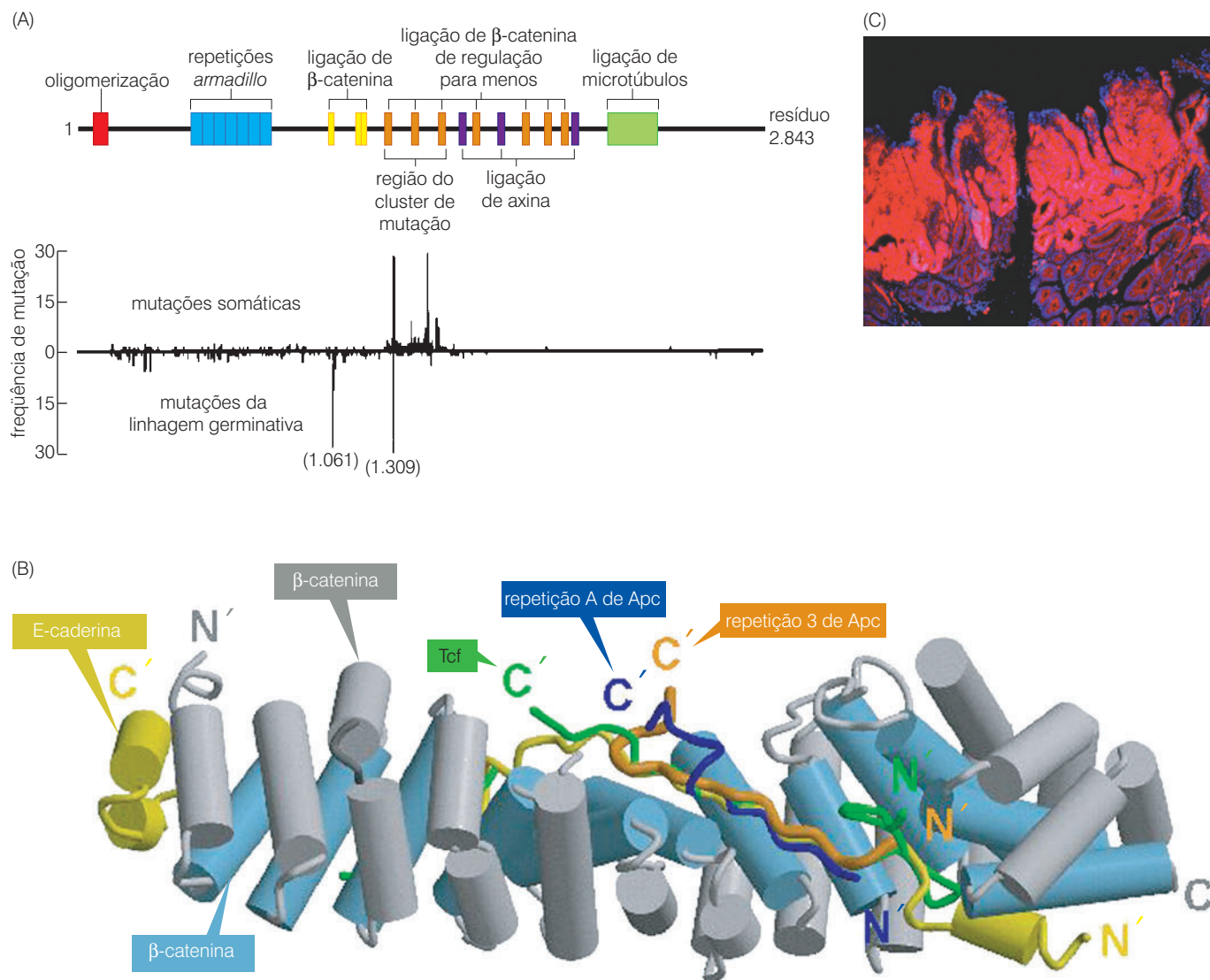


Figura 7.25 Apc, β -catenina e Tcf/Lef (A) Este diagrama indica em destaque a estrutura multidomínio de Apc (acima) com um gráfico do espectro de mutações de APC e onde elas ocorrem (abaixo). (B) Como é aparente, a molécula de β -catenina (cilindros azul-claro e cinza) associa-se a vários parceiros proteicos alternativos durante seu ciclo de vida. Após sua síntese, pode ser ligada no citosol a um domínio da proteína Apc (azul-escuro, laranja), o que a torna alvo para destruição no proteossoma. Se ela escapa à destruição, pode usar o mesmo domínio para ligar-se ao domínio citoplásmico de um receptor da superfície celular chamado E-caderina (amarelo), como veremos nos Capítulos 13 e 14. Alternativamente, β -catenina pode migrar para o núcleo, onde se associará a um domínio de um fator de transcrição Tcf/Lef (verde) e ativará a expressão de um número de genes-alvo. Como aparente, todos os parceiros ligadores de β -catenina têm domínios estruturais similares que usam para ligar β -catenina. (C) No modelo de

camundongo Min de polipose familiar, uma mutação pontual inativadora foi introduzida no gene APC pela ação de químicos mutagênicos. A região cromossômica carregando esse alelo mutante sofre LOH em algumas células das criptas intestinais, gerando células sem atividade de Apc. Nestas células, β -catenina não é mais degradada, acumula a altos níveis e entra no núcleo celular, em que colabora com fatores de transcrição para direcionar a expressão de genes promotores de crescimento. O resultado é um crescimento clonal externo, como o adenoma visto aqui, no qual a β -catenina é visualizada por imunocoloração (rosa, acima), enquanto os núcleos de todas as células, incluindo aqueles de criptas normais (abaixo), são vistos em azul. (A, de P. Plakis, *Biochim. Biophys. Acta* 1332:F127-F147, 1997 e adaptada de R. Fodde et al., *Nat. Rev. Cancer* 1:55-67, 2001; B, cortesia de H.J. Choi e W.I. Weiss, e de N.C. Ha et al., *Mol. Cell.* 15:511-521, 2004; C, cortesia de K.M. Haigis e T. Jacks.)

culas mutantes de β -catenina escapam da degradação e se acumulam – precisamente a consequência observada quando Apc está ausente!

Quando β -catenina se acumula em precursores de enterócitos pela inativação de função de Apc ou outros mecanismos (Figura 7.25C), faz com que eles retenham um fenótipo semelhante ao de célula-tronco, o que os impede de migrar para fora das criptas. Isso leva, por sua vez, ao acúmulo de um grande número de células relativamente não-diferenciadas na cripta do cólon (veja a Figura 7.24A), formando, por fim, pólipos adenomatosos. Igualmente importante, estas células podem, mais tarde, sustentar mutações que as capacitem a formar pólipos mais avançados e, seguidos de mais mutações, carcinomas.

Esse modelo explica a sequência de mutações que leva finalmente à formação de células de carcinoma de cólon humano. A primeira de tais mutações envolve invariavelmente a inativação de função de Apc (ou as mudanças equivalentes mencionadas anteriormente). As células resultantes, agora aprisionadas nas criptas, podem sofrer mutações em muitos outros genes, como *K-ras* (Seção 4.4), que fazem essas células crescerem mais agressivamente. Alterações da via Apc- β -catenina sempre vêm primeiro, enquanto a ordem das subseqüentes alterações genéticas é bem variável.

Pesquisas recentes têm apontado uma outra consequência completamente inesperada da perda de Apc. Demonstrou-se que células sem função de Apc exibem um acentuado aumento na instabilidade cromossômica (CIN), o que resulta em aumento e diminuição do número de cromossomos, geralmente pela segregação inapropriada de cromossomos durante mitose. Algumas células Apc negativas até mesmo acumulam cariótipos tetraplóides (ou quase tetraplóides), nos quais a maioria dos cromossomos é representada em quatro cópias em vez das duas usuais. Esse defeito parece derivar do fato de que, em adição a funções citoplásmicas de Apc descritas anteriormente, moléculas de Apc localizam-se junto a componentes dos arranjos de microtúbulos do fuso acromático e são responsáveis pela segregação cromossômica durante a anáfase e a telófase da mitose. A aneuploidia resultante desses defeitos na segregação cromossômica altera o número relativo de genes críticos promotores e inibidores do crescimento. Essas mudanças, por sua vez, podem facilitar tumorigênese pela aceleração da taxa com a qual células pré-malignas adquirem genótipos vantajosos e, assim, fenótipos.

7.12 Doença de Von Hippel-Lindau: pVHL modula a resposta hipóxica

A síndrome de Von Hippel-Lindau é uma predisposição hereditária ao desenvolvimento de vários tumores, incluindo carcinomas de células claras do rim, feocromocitomas (tumores de células da glândula adrenal) e **hemangioblastomas** (tumores dos vasos sanguíneos) de sistema nervoso central e retina. Mutações na linhagem germinativa do gene supressor de tumor *VHL* têm sido documentadas em quase todos os pacientes que sofrem da síndrome. Alelos *VHL* mutantes parecem estar presentes no conjunto de genes humanos em uma frequência que resulta em uma incidência da doença de cerca de um em 35 mil na população em geral. Como alelos mutantes de *Rb*, os alelos *VHL* mutantes agem ao nível organismal de maneira dominante autossômica para criar a doença. E expandindo a analogia a *Rb*, o loco *VHL* sofre uma perda de heterozigiosidade (LOH) que resulta em um genótipo *VHL*^{-/-} nas células tumorais de pacientes que herdaram um alelo *VHL* mutante de linhagem germinativa.

O gene *VHL* é também inativado na maioria (cerca de 70%) dos carcinomas esporádicos (i. e., não-familiares) de rim. Nos tumores esporádicos nos quais alelos mutantes de *VHL* não são detectáveis, o silenciamento transcricional deste gene devido a metilação de promotor é frequentemente encontrado. A principal, porém aparentemente não a única, função de pVHL, o produto do gene *VHL*, é promover a destruição de uma subunidade de um fator de transcrição crítico chamado fator-1 induzível por hipoxia (HIF-1).

Em células experimentando tensões normais de oxigênio (**normoxia**), pVHL provoca a degradação da subunidade HIF-1 α do HIF-1. Conseqüentemente, HIF-1 α é sintetizada e

Barra lateral 7.8 Ubiquitinação marca proteínas celulares para destruição em proteossomas A concentração de muitas proteínas celulares deve ser firmemente controlada em resposta a uma variedade de sinais fisiológicos. Muito desse controle é alcançado pela degradação seletiva dessas proteínas. Assim, sob certas condições, uma proteína pode ter vida longa e pode, portanto, acumular-se dentro da célula, enquanto sob outras circunstâncias ela é rapidamente degradada a uma taxa regulada por certos sinais fisiológicos. Essa degradação é realizada, quase sempre, pelo sistema ubiquitina-proteossoma (Tabela 7.3).

Para citar um exemplo, muitas proteínas são fosforiladas em aminoácidos importantes por uma cinase, uma vez que sua degradação é

Tabela 7.3 Vantagens da proteólise regulada por ubiquitina

- A. Não-direcional – diferentemente de fosforilação e outras modificações pós-traducionais de proteínas, degradação não pode ser revertida
- B. Rapidez – um grande número de moléculas de proteína pode ser eliminado de uma maneira regulada em questão de minutos
- C. Ajuste fino – provê outro modo de ajustar finamente os níveis de proteínas reguladoras críticas
- D. Localizada – pode ser confinada a compartimentos sub-celulares específicos
- E. Especificidade – um pequeno conjunto de proteínas pode ser degradado sem qualquer efeito nas outras proteínas

Cortesia de M. Pagano.

ordenada. O fosfoaminoácido resultante, no contexto de resíduos de aminoácidos vizinhos, atrai um complexo de enzimas que ancoram covalentemente uma molécula de ubiquitina à proteína – o processo de **ubiquitilação** (frequentemente chamado ubiquitinação). Como um mecanismo alternativo, a exposição, por uma proteína, de um de seus normalmente escondidos subdomínios pode atrair a atenção de um complexo de ubiquitinação mesmo sem a marcação específica criada por fosforilação.

Ubiquitina é uma proteína pequena (76 resíduos) cuja sequência é muito conservada entre eucariotos unicelulares e células de mamíferos; somente 3 de 76 aminoácidos diferem entre as versões dessa proteína em humanos e leveduras. (Sua presença em toda a biosfera inspirou seu nome.) Uma molécula de ubiquitina é inicialmente ligada via sua glicina C-terminal à ϵ -amina da cadeia lateral de uma lisina presente em um alvo proteico; uma segunda molécula de ubiquitina é então ligada à lisina 48 da primeira ubiquitina, e o processo é repetido muitas vezes, produzindo uma cadeia de poliubiquitina (Figura 7.26). A molécula proteica etiquetada dessa forma direciona-se para o proteossomo no núcleo ou no citoplasma, no qual é degradada. (Uma versão alternativa da cadeia de poliubiquitina, na qual ligações ubiquitina-ubiquitina são formadas através dos resíduos lisina 63 de monômeros de ubiquitina, parece estar envolvida na ativação funcional de proteínas marcadas em vez de sua degradação.)

A ampla importância dessa maquinaria de degradação de proteína é indicada pelo fato de que análise de sequência de aproximadamente 20.000 genes no genoma humano indicou que pelo menos 527 genes provavelmente codificam ubiquitinas ligases E3 – as pro-

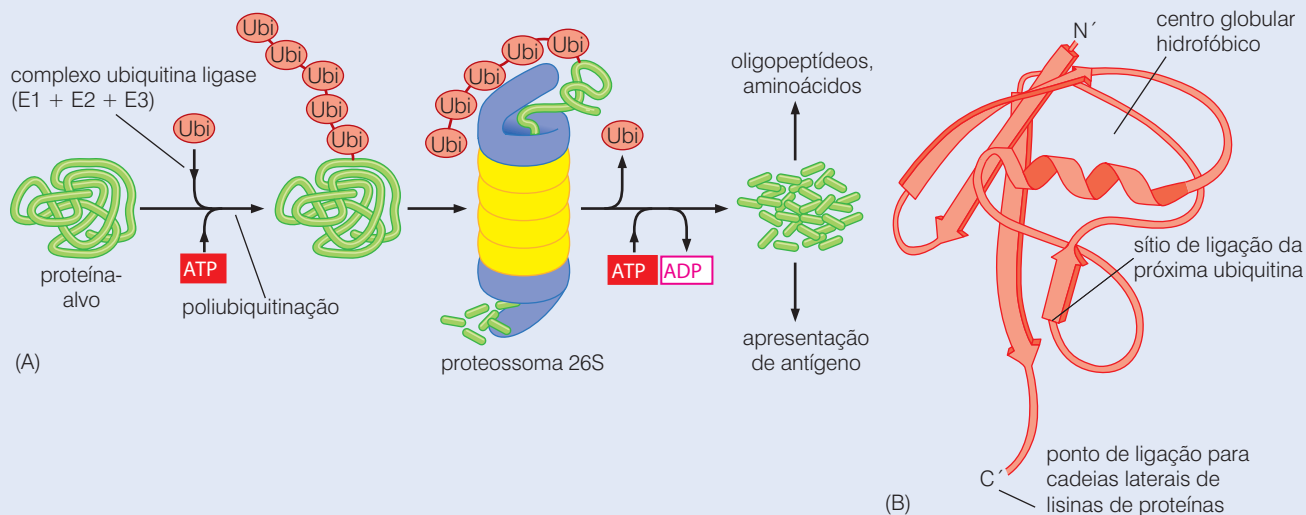


Figura 7.26 Ubiquitinação e proteossomos Muito da degradação de proteínas em células de mamíferos é conduzida pela rota da ubiquitina-proteossomo. (A) Um complexo de três proteínas (E1, E2 e E3), que juntas constituem uma ubiquitina ligase, reconhece uma proteína destinada para degradação e a marca com uma cadeia de ubiquitinas (Ubi). Seguidamente à poliubiquitinação, a proteína é levada a um proteossomo (veja a Figura 7.27), no qual é desubiquitinada e degradada em oligopeptídeos que são ou

degradados em aminoácidos ou usados para apresentação de antígenos pelo sistema imune; (veja a Seção 15.3). (De fato, um proteossomo especializado é usado para processar proteínas para apresentação de antígenos.) (B) Ubiquitina é uma proteína relativamente pequena de 76 resíduos de aminoácidos cujas sequência e estrutura são quase totalmente conservadas entre todas as células eucarióticas. Sua estrutura é indicada aqui neste diagrama, determinada por cristalografia de raios X.

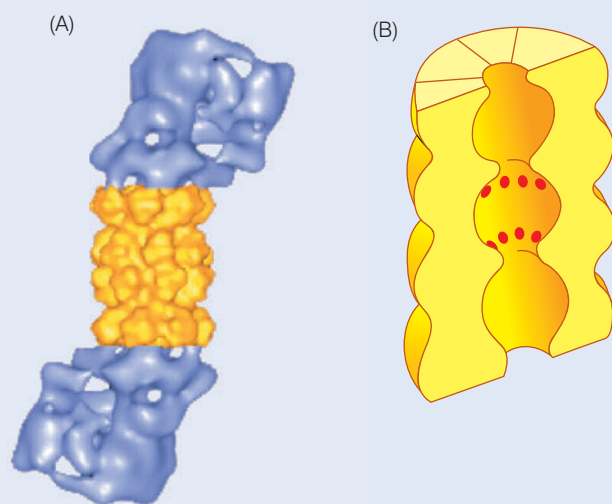


Figura 7.27 O proteossomo O proteossomo é um complexo de cerca de 2,5 megadaltons composto de mais de 30 espécies protéicas distintas. (A) Esta imagem reconstruída de um proteossomo, determinada por cristalografia de raios X, indica duas regiões *cap* (*púrpura*), onde proteínas ubiquitinadas são ligadas, desubiquitinadas e então introduzidas na

região de barril centralmente localizada (*amarelo*), na qual elas são processadas por degradação proteolítica em oligopeptídeos ou resíduos de aminoácidos. (B) Um diagrama esquemático da região de barril em corte longitudinal indica a região (*pontos vermelhos*) onde a proteólise real acontece. (A, de W. Baumeister et al., *Cell* 92:367-380, 1998.)

teínas responsáveis pelo reconhecimento inicial dos substratos protéicos que devem ser marcados para ubiquitinação e destruição; outra análise identificou 110 enzimas candidatas para desubiquitinação (DUBs).

Proteossomos são organelas celulares dedicadas à degradação de proteínas apresentadas a eles. O proteossomo é um complexo grande, oco, cilíndrico, de múltiplas subunidades protéicas, que usa ATP para desdobrar uma proteína previamente à degradação dela no interior do cilindro (Figura 7.27). Proteínas poliubiquitinadas introduzidas no proteossomo são primeiramente desubiquitinadas e então digeridas em pequenos fragmentos peptídicos variando em tamanho de 3 a 25 resíduos de aminoácidos.

Sabe-se que a poliubiquitinação é conhecida ser responsável pela degradação de muitas proteínas de vida curta, reguladoras do crescimento, como Myc, p53, Jun e certas ciclinas (a serem descritas no Capítulo 8), e mais de 80% das proteínas em células de mamíferos estão nos proteossomos. Enquanto poliubiquitinação marca proteínas para destruição, a função de monoubiquitinação (em que apenas uma ubiquitina é ligada) é complexa e pouco compreendida. Há claras indicações de que monoubiquitinação é usada em certos contextos celulares para regular endocitose, recrutamento de proteínas, tráfego de proteínas dentro do núcleo e até regulação da expressão gênica. Por exemplo, a monoubiquitinação da proteína supressora de tumor p53 a marca para exportação do núcleo; a poliubiquitinação subsequente pode então marcar p53 para destruição em proteossomos. Uma dimensão adicional de complexidade deriva do fato de que ubiquitina é apenas uma de um grupo de cerca de 10 proteínas marcadoras (p. ex., as proteínas semelhantes à ubiquitina Sumo e Nedd) usadas para marcar várias proteínas, marcando-as para uma variedade de destinos metabólicos que não proteólise.

então degradada com uma meia-vida de apenas 10 minutos. O resultado é que HIF-1 α acumula somente a baixíssimos níveis em estado estacionário nas células, e, portanto, o fator de transcrição funcional HIF-1, o qual é composto de duas subunidades essenciais – HIF-1 α e HIF-1 β – permanece inativo (Figura 7.28).

Tal síntese seguida de rápida degradação é freqüentemente chamada “ciclo fútil”. Esse ciclo particular é interrompido quando células experimentam **hipoxia** (tensões subnormais de oxi-

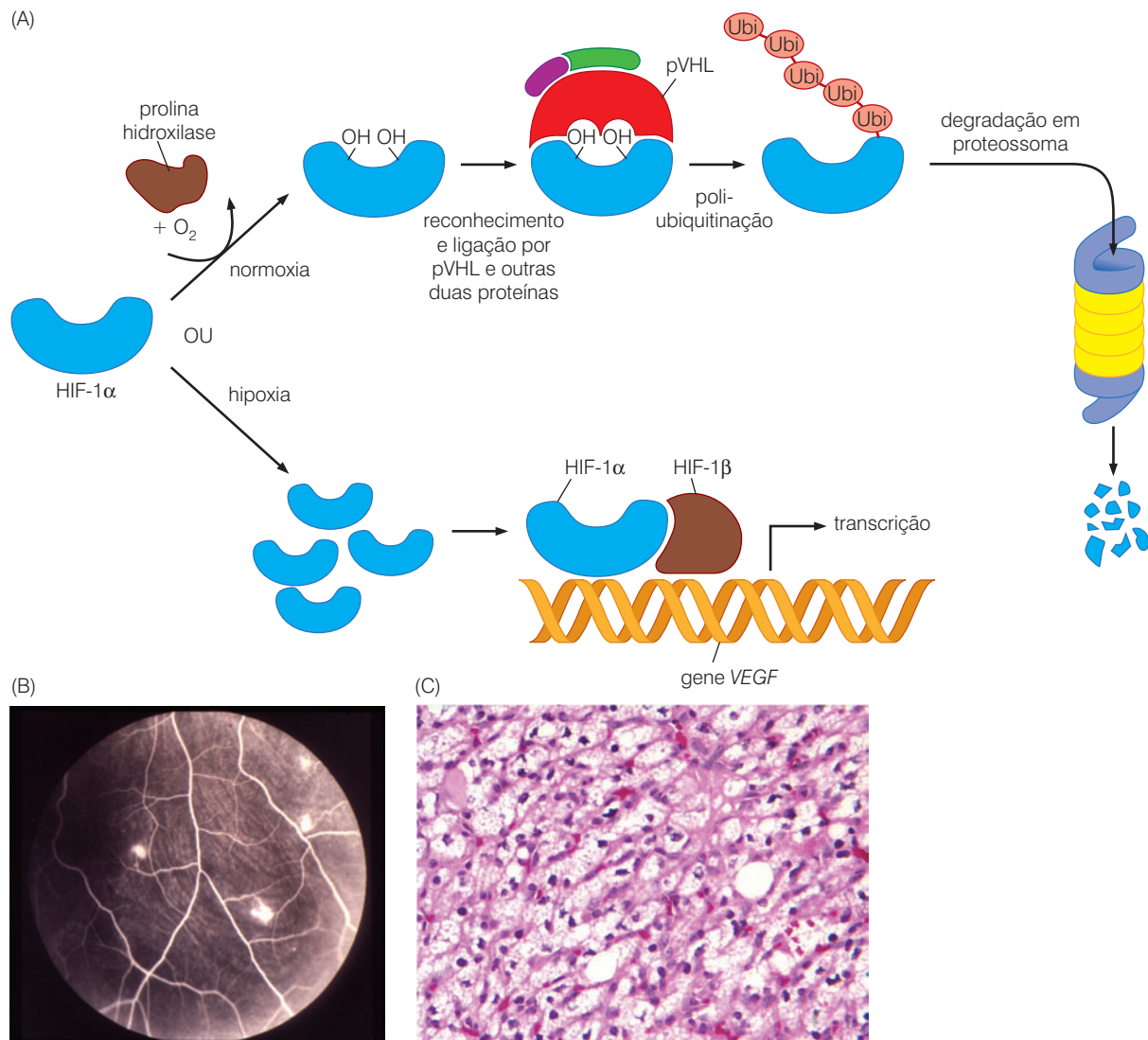


Figura 7.28 HIF-1 e sua regulação por pVHL (A) O fator de transcrição-1 induzido por hipoxia (HIF-1) é composto de duas subunidades, HIF-1 α e HIF-1 β , ambas necessárias para sua função ativadora de transcrição. Sob condições de normoxia (*acima*), HIF-1 α (*azul*) é sintetizada a uma alta taxa e quase imediatamente degradada pela ação de pVHL (*vermelha*). Sob tais condições, prolina hidroxilase (*marrom*), uma enzima que contém ferro e é responsável pela oxidação de dois resíduos de prolina de HIF-1 α , é capaz de converter um ou ambos resíduos em resíduos de hidroxiprolina (*indicado aqui como grupos hidroxila*). Essas hidroxiprolinas permitem a ligação de HIF-1 α a pVHL, que, juntamente com duas outras proteínas (*púrpura, verde*), marcam HIF-1 α por ubiquitinação para degradação. Contudo, sob condições de hipoxia (*abaixo*), a prolina hidroxilase falha na oxidação das duas prolinas de HIF-1 α , pVHL falha na ligação a HIF-1 α , HIF-1 α

escapa da ubiquitinação e seu nível aumenta rapidamente. Ela pode agora formar heterodímeros com HIF-1 β (*marrom*), e o fator de transcrição heterodimérico resultante pode proceder com a ativação da expressão de genes fisiologicamente importantes, como o gene que especifica o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). (Como descrito no Capítulo 13, VEGF é um importante indutor de angiogênese.) (B) Uma das manifestações da síndrome de von Hippel-Lindau é a presença de áreas de vascularização incontrolada na retina, vistas aqui como grandes pontos brancos; estas são ostensivas devido à produção excessiva de VEGF em células que perderam função de pVHL. (C) Uma consequência mais extrema da perda de função de pVHL é um hemangioblastoma, o qual surge de precursores de células endoteliais estimuladas por VEGF. (B e C, cortesia de W.G. Kaelin Jr.)

gênio), condição sob a qual a degradação de HIF-1 α falha e níveis de HIF-1 α aumentam em minutos. (Sua meia-vida, e, portanto, sua concentração, aumenta mais de dez vezes.) A resultante formação de complexos do fator de transcrição HIF-1 funcional causa expressão de um grupo de genes-alvo cujos produtos estão envolvidos em **angiogênese** (geração de novos vasos sanguíneos), **eritropoiese** (formação de células sanguíneas vermelhas), metabolismo de energia (glicólise, especificamente) e transporte de glicose para dentro das células. A razão é induzir síntese de proteínas que capacitam uma célula a sobreviver sob condições de hipoxia a curto prazo e, a longo prazo, adquirir acesso a um suprimento adequado de oxigênio. Notáveis entre estas últimas estão proteínas que colaboram para atrair o crescimento de novos vasos na área de hipoxia de um tecido. Como descreveremos mais tarde (Seção 13.6), essa formação de novos vasos é também importante para o crescimento de tumores, capacitando-os a adquirir acesso a oxigênio e nutrientes e a evacuar dióxido de carbono e restos metabólicos.

A importância de HIF-1 na regulação da resposta angiogênica é ressaltada pelo exército de genes cuja expressão ela induz, entre eles os genes que codificam fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF) e fator- α de crescimento transformante (TGF- α), e ainda outros que também promovem angiogênese. VEGF atrai e estimula o crescimento de células endoteliais que constroem novos vasos sanguíneos; PDGF estimula estas células, bem como células mesenquimais associadas, como perócitos e fibroblastos; e TGF- α estimula uma larga variedade de tipos celulares, incluindo células epiteliais. No rim em hipoxia, HIF-1 medeia a indução do gene que codifica eritropoietina (EPO). Isso leva a rápido aumento de eritropoietina na circulação e a uma indução da produção de células vermelhas na medula óssea (veja também a Barra lateral 6.2 e a Seção 6.8).

No que diz respeito aos detalhes de função de *VHL*, seu produto, pVHL, existe em células em um complexo com muitas outras proteínas. Juntas, elas funcionam para adquirir uma molécula de ubiquitina e para ligar esta molécula covalentemente a proteínas substrato específicas (Barra lateral 7.8). Como discutido anteriormente neste capítulo, uma vez que uma proteína é marcada por poliubiquitinação, ela é geralmente destinada para transporte para complexos de proteossomas, nos quais será degradada. Dentro do complexo multiprotéico, pVHL é responsável pelo reconhecimento e ligação de HIF-1 α , portanto trazendo as outras proteínas no complexo (Figura 7.29) para muito perto de HIF-1 α , a qual elas ubiquitinam.

pVHL liga-se a HIF-1 α somente quando uma das duas prolinas críticas de HIF-1 α tiver sido oxidada à hidroxiprolina; na ausência de uma hidroxiprolina, essa ligação falha, e HIF-1 α escapa da degradação. A conversão dos resíduos de prolina de HIF-1 α em hidroxiprolina é desempenhada por uma enzima que depende de oxigênio para sua atividade. Uma vez formada, a hidroxiprolina de HIF-1 α pode ser inserida em uma espaço do centro hidrofóbico de pVHL. Isso capacita pVHL a ligar HIF-1 α e disparar sua degradação e, como uma conse-

Figura 7.29 Detalhes moleculares da interação de HIF-1 α -pVHL (A) Na presença de altos níveis de oxigênio, uma enzima prolina hidroxilase oxidará um dos dois resíduos de prolina no fator de transcrição HIF-1 α , convertendo-a em uma hidroxiprolina (Hyp). (B) Uma vez formada no HIF-1 α (p. ex., Hyp no resíduo 564, *bolas verde claras*), hidroxiprolina capacita um domínio de HIF-1 α (*azul-claro*) a associar-se a um complexo tripartido de pVHL (*vermelho*) e a duas outras proteínas, elonguina B (*púrpura*) e elonguina C (*verde*). Essa ligação, por sua vez, capacita o complexo tripartido a ubiquitinar HIF-1 α , o que leva rapidamente à sua destruição nos proteossomas. (De J.-H. Min et al., *Science* 296:1889, 2002.)

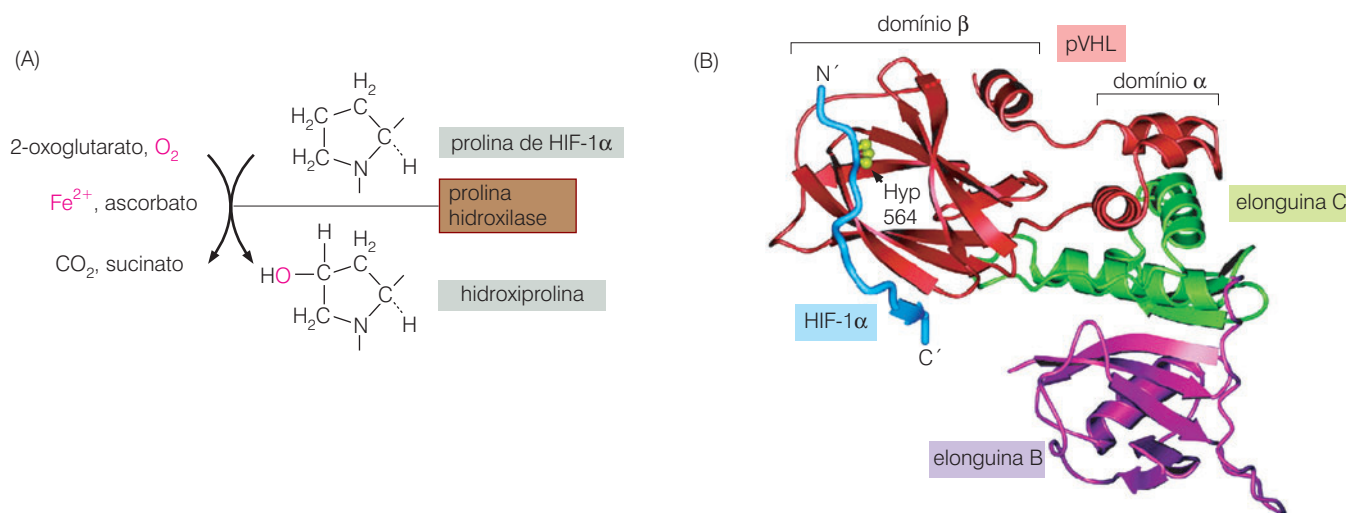
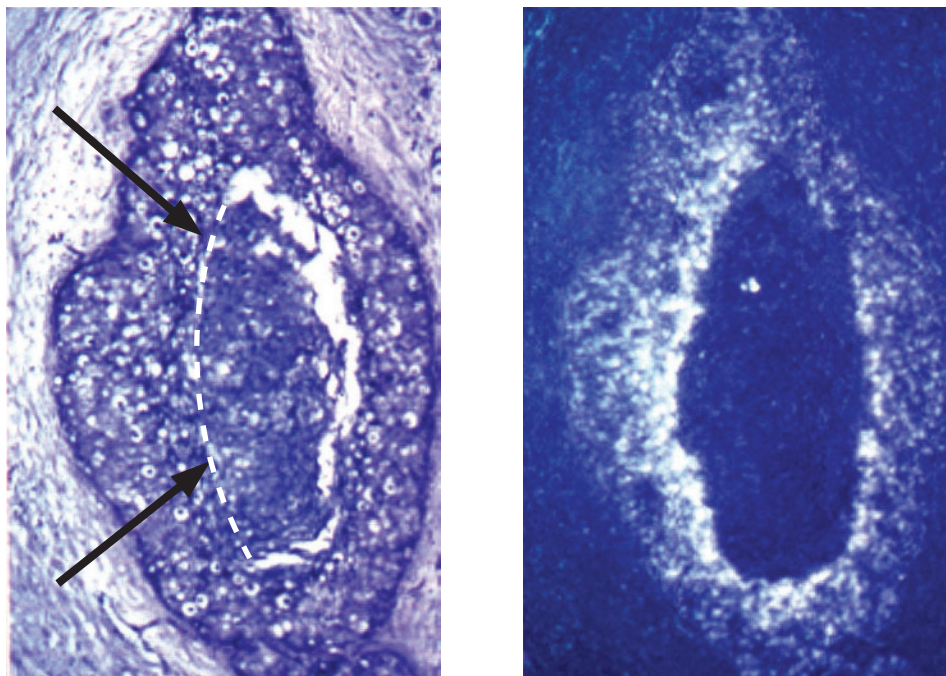


Figura 7.30 Expressão do alvo VEGF de HIF-1. Notável entre os genes ativados por HIF-1, está o gene codificando VEGF (fator de crescimento endotelial vascular; veja a Figura 7.28A). Visto aqui (*esquerda*), está um câncer de mama humano *in situ* que permanece localizado e, assim, ainda não invadiu o estroma ao redor. Uma grande área de células necróticas formou-se no centro do tumor (*setas, linha tracejada*). O uso de um protocolo de hibridização *in situ* (*direita*) revela que o RNA VEGF (*áreas brancas*) é expresso em um gradiente crescente, de baixos níveis na porção externa do tumor (onde oxigênio é disponível) para a expressão intensa na direção do centro de hipoxia do tumor. Áreas de maior hipoxia são incompatíveis com sobrevivência de células, explicando o grande centro necrótico do tumor, em que mRNA VEGF não é mais detectável. (Cortesia de A.L. Harris.)



quência, a indução de transcrição gênica pelo fator de transcrição HIF-1 é prevenida (veja a Figura 7.28A).

Esses fatos permitem-nos racionalizar como pVHL funciona em células normais e falha em certas células: sob condições normais de tensão de oxigênio (normoxia), HIF-1 α apresenta uma ou duas hidroxiprolinas, é reconhecida por pVHL e rapidamente destruída. Sob condições de hipoxia, pVHL não tem essas hidroxiprolinas, não pode ser ligado por pVHL e acumula-se em altos níveis que permitem o funcionamento do fator de transcrição HIF-1. Por sua vez, isso possibilita a ativação da expressão de VEGF em tecidos com hipoxia, tanto normais como neoplásicos (Figura 7.30).

Barra lateral 7.9 Policitemia familiar também pode resultar de defeitos em VHL Curiosamente, uma mutação pontual específica na linhagem germinativa no gene *VHL*, enquanto reduz a habilidade da proteína VHL de associar-se a HIF-1 α , não cria síndrome de Von Hippel-Lindau. Ela resulta, em vez disso, em *policitemia* familiar, na qual indivíduos afetados produzem células vermelhas demais por causa de excessivos níveis de produção de eritropoietina (EPO), que são dirigidos, por sua vez, por níveis além do normal de HIF-1 α . Assim, essa mutação particular de *VHL* parece afetar preferencialmente apenas um dos muitos alvos conhecidos de ação de HIF-1, indicando que VHL deve influenciar, de modos ainda desconhecidos, a ação de HIF-1 em promotores gênicos específicos.

Em muitos dos tumores associados a alelos mutantes de *VHL*, a proteína pVHL é indetectável nas células cancerosas individuais. Ainda em outros tumores, mudanças mais súbitas podem causar inatividade de pVHL sem afetar seus níveis. Por exemplo, mutações pontuais podem alterar os resíduos de aminoácidos no bolso hidrofóbico de pVHL que reconhece e liga-se aos resíduos de hidroxiprolina de HIF-1 α . Por qualquer mecanismo, a atividade constitutiva resultante do fator de transcrição HIF-1 dirige a expressão de vários poderosos genes promotores de crescimento, incluindo VEGF, PDGF e TGF- α . Estes procedem à estimulação de proliferação de uma variedade de tipos celulares carregando os receptores correspondentes. O resultado, mais cedo ou mais tarde, é um ou outro tipo de tumor. Além disso, as células tumorais resultantes podem causar o acúmulo de VEGF na circulação; VEGF pode então ajudar a estimular eritropoiese na medula óssea, explicando a anormalmente alta contagem de células sanguíneas vistas em alguns pacientes com von Hippel-Lindau.

Ainda assim, essas descrições da ação de pVHL não explicam todos os fenótipos que resultam do seu mal funcionamento (Barra lateral 7.9). Assim, está claro que pVHL tem efeitos desconectados com HIF-1 α e sua degradação. Por exemplo, células sem pVHL funcional são incapazes de montar fibronectina apropriadamente em sua matriz extracelular, e foi reportado que pVHL liga fibronectina dentro das células. Além disso, uma substancial quantidade de pVHL está associado a microtúbulos citoplasmáticos cuja estabilidade ele pode afetar. Essas observações enigmáticas fornecem pistas de que pVHL opera para controlar respostas celulares que nada têm a ver com as tensões de oxigênio experimentadas pelas células.

7.13 Sinopse e perspectivas

Os genes supressores de tumor constituem um grande grupo de genes que especificam produtos protéicos mediando diversas funções fisiológicas celulares. Como é óbvio na Tabela 7.1, essas proteínas operam em todas as partes da célula, e há apenas um atributo compartilhado que permite sua inclusão neste grupo gênico: de um jeito ou de outro, cada um desses genes normalmente funciona para reduzir a probabilidade de que um tumor clinicamente detectável apareça em um dos tecidos do corpo.

Na grande maioria dos casos, ambas as cópias de um gene supressor de tumor devem ser desativadas antes que uma célula cancerosa incipiente aproveite qualquer vantagem proliferativa ou de sobrevivência. Mas essa regra não é tão direta. Em alguns exemplos, como o caso do gene *Nf1*, parece que a perda de uma cópia de um gene supressor de tumor já proporciona a vantagem de crescimento para uma célula – um exemplo do fenômeno de haploinsuficiência. E, como veremos no Capítulo 9, alelos mutantes de outro gene supressor de tumor – *p53* – pode criar um fenótipo celular parcialmente mutante pela interferência ativa nas atuais funções de um alelo tipo selvagem coexistente na mesma célula.

A descoberta de genes supressores de tumor ajudou a explicar um dos grandes mistérios da biologia de cânceres humanos – as síndromes de câncer familiar. Como vimos neste capítulo, a herança de um alelo defeutivo de um desses genes é freqüentemente compatível com desenvolvimento embrionário normal. Os efeitos fenotípicos desse defeito genético podem somente tornar-se aparentes com grande atraso, às vezes na meia idade, quando sua presença é revelada pela perda do alelo tipo selvagem restante e o crescimento de um tipo particular de tumor. A eliminação dos alelos tipo selvagem freqüentemente envolve eventos de perda de heterozigosidade (LOH); e a repetidamente observada LOH em certas regiões cromossômicas em um grupo de tumores pode servir como uma indicação da presença de um ainda não identificado gene supressor de tumor atuando nessa região. De fato, um grande número de regiões cromossômicas de LOH recorrentes tem sido identificado em genomas de células tumorais, mas apenas relativamente poucas destas tem gerado genes supressores de tumor clonados até agora. Isso significa que o número destes genes deve ser bem maior do que é indicado pelos dados na Tabela 7.1.

Os diversos comportamentos desses genes destacam uma contínua dificuldade nessa área da pesquisa do câncer: que critérios podem ser usados para definir um gene supressor de tumor? Para começar, neste livro, incluímos na família de genes supressores de tumor somente aqueles genes cujos produtos operam de alguma maneira dinâmica para restringir proliferação ou sobrevivência celular. Outros genes que funcionam indiretamente para prevenir câncer por suas habilidades de manter o genoma e suprimir mutações são descritos no Capítulo 12. Da perspectiva dos geneticistas, essa divisão – a dicotomia entre os *gatekeepers* e os *caretakers* – é arbitrária, uma vez que a versão tipo selvagem de ambos os tipos de genes é freqüentemente eliminada ou desativada nos genomas de células cancerosas. Além disso, os padrões de herança das síndromes de câncer associadas a genes *caretakers* defeitivos são formalmente idênticos aos mecanismos descritos aqui. Ainda, para aqueles que gostariam de entender os mecanismos biológicos da formação de câncer, a distinção entre genes supressores de tumor (*gatekeepers*) e de manutenção de genoma (*caretakers*) é muito útil e, portanto, largamente adotada por pesquisadores interessados na patogênese do câncer.

Desde a época em que os primeiros genes supressores de tumor (*p53* e *Rb*) foram clonados, inúmeros outros genes têm sido colocados como “candidatos” a genes supressores de tumor porque sua expressão está diminuída ou ausente em células cancerosas enquanto era facilmente detectável nas células normais correspondentes. Esse critério para participação na família de genes supressores de tumor foi logo considerado falho, em grande parte porque é freqüentemente impossível identificar o precursor normal de uma célula cancerígena sob estudo. Certos tipos de células tumorais podem não expressar um gene particular por causa de um programa de expressão gênica que é usado durante diferenciação normal do tecido no qual essas células tumorais surgiram. Assim, a ausência de expressão de tal gene em uma

célula tumoral pode refletir apenas as ações de um programa de diferenciação normal em vez de uma perda patológica de expressão gênica. Logo, esse critério – ausência de expressão gênica – é dificilmente elucidativo.

Em certos exemplos, a expressão de um candidato a gene supressor de tumor pode estar presente nos precursores normais claramente idênticos de um grupo de células tumorais e ausentes nas células tumorais. Isso pareceria fornecer um pouco mais de apoio para a candidatura de tal gene. Mas mesmo esse tipo de evidência não é conclusivo, uma vez que a ausência de expressão gênica em uma célula cancerosa pode frequentemente ser uma das muitas *consequências* do processo de transformação, e não uma de suas *causas*. Assim, a inativação de tal gene pode não ter tido papel algum na formação da célula tumorigênica.

Respondendo a essas críticas, pesquisadores têm desenvolvido testes funcionais de seus candidatos favoritos a genes supressores de tumor. Em particular, eles introduziram versões tipo selvagem clonadas de tais genes em células cancerosas que não apresentavam qualquer expressão deles. O objetivo era mostrar que, uma vez que a função do gene supressor de tumor tipo selvagem é restaurada em tais células cancerosas, elas se reverterem parcial ou completamente para um fenótipo de crescimento normal ou podem mesmo entrar em apoptose. Entretanto, a interpretação desses experimentos foi complicada pelo fato de que a expressão *ectópica* de muitos genes – sua expressão em uma célula hospedeira na qual eles normalmente não são expressos – e sua expressão em níveis não-naturalmente altos frequentemente tornam as células bastante desconfortáveis e causam interrupção do crescimento e até mesmo morte. Tais respostas são geralmente observadas seguindo a introdução de uma variedade de genes que jamais seriam considerados genes supressores de tumor.

Assim, esse teste funcional foi tornado mais rigoroso pela determinação de se um candidato a gene supressor de tumor, quando expresso em níveis fisiológicos normais, pára o crescimento de uma célula sem expressão desse gene enquanto células normais tipo selvagem do mesmo tecido não são afetadas. Isso parece prover forte evidência em favor da candidatura de um provável gene supressor de tumor. Mas mesmo esses experimentos produzem consequências que não são sempre interpretáveis, devido às dificuldades, citadas anteriormente, na identificação de tipos celulares normais que são controles apropriados das células cancerosas sendo estudadas.

As ambigüidades desses testes funcionais precisaram do uso de critérios genéticos para validar a candidatura de muitos prováveis genes supressores de tumor. Se um gene repetidamente sofre LOH em genomas de células tumorais, então certamente sua candidatura ganha mais crédito. Mas aqui há muita ambigüidade. Afinal, genes que repetidamente sofrem LOH podem estar intimamente ligados em um cromossomo a um *autêntico* gene supressor de tumor que é um verdadeiro alvo para eliminação durante desenvolvimento de tumor.

Tais considerações levaram a uma definição genética mais estrita de um gene supressor de tumor: um gene pode ser chamado supressor de tumor somente se ele sofre LOH em muitos genomas de células tumorais e se os alelos homozigóticos resultantes carregam claras e óbvias mutações desativadoras. (Este último critério deveria permitir a um investigador descontar quaisquer genes próximos que estejam proximamente ligados a um gene supressor de tumor em cromossomos humanos.)

Não surpreendentemente, mesmo esses rígidos critérios genéticos provaram ser falhos, uma vez que eles excluem certos genes que são provavelmente genuínos genes supressores de tumor. Considere o fato de que a atividade de muitos genes supressores de tumor possa ser eliminada por metilação de promotor (Seção 7.8). Nesse evento, alelos mutantes podem raramente ser encontrados em genomas de células tumorais, embora o gene tenha sido efetivamente silenciado. Lembre, por exemplo, do comportamento do gene *Runx3*, o qual pode ser um gene supressor de tumor. Até agora, seu silenciamento funcional tem sido associado inteiramente a metilação em vários genomas de tumor. (O fato de que mutações desativadoras não foram reportadas nas cópias do gene *Runx3* associadas a tumor deixa seu *status* ambíguo.)

A habilidade de desativar (“nocautear”) candidatos a genes supressores de tumor na linhagem germinativa de camundongo (Barra lateral 7.10) provê ainda uma outra poderosa ferramenta para validar esses candidatos. A biologia de roedores e humanos difere em muitos aspectos. Entretanto, as características fundamentais compartilhadas da biologia de mamíferos torna possível modelar muitos aspectos da biologia tumoral humana no camundongo de laboratório.

Quase todos os genes que estão listados na Tabela 7.1 foram nocauteados na linhagem germinativa de uma linhagem autofecundada de camundongo. Foi descoberto que, para a maior parte, heterozigotos resultantes exibem suscetibilidade aumentada a um ou outro tipo de câncer. Em muitos exemplos, o tecido particular que é afetado é bastante diferente daquele observado nos humanos. Por exemplo, camundongos heterozigotos para *Rb* (i. e., *Rb*^{+/-}) tendem a desenvolver tumores pituitários em vez de retinoblastomas – uma consequência nada surpreendente, dados os diferentes tamanhos e dinâmicas de crescimento de populações de células-alvo em tecidos de camundongo comparadas com seus respectivos em humanos. Além disso, o desenvolvimento de qualquer tipo de tumor a uma frequência elevada em tais camundongos geneticamente alterados adiciona evidência persuasiva para apoiar a candidatura do gene como um gene supressor de tumor.

Tudo isso explica por que uma constelação de critérios é agora invocada para apoiar a avaliação de pretendentes à participação nesse exclusivo “club” gênico. Talvez o mais contundente critério seja funcional: pode a habilidade supressora de tumor de um candidato a gene supressor de tumor ser racionalizada em termos das atividades bioquímicas de sua proteína codificada e da conhecida posição dessa proteína no circuito regulador dessa célula?

No final, essas muitas complicações na validação de candidatos a genes supressores de tumor derivam de um fato central: a própria existência de um gene supressor de tumor torna-se aparente somente quando ele está ausente. Isso estabelece a base de todas as dificuldades que têm atrasado a pesquisa com genes supressores de tumor e salienta as dificuldades que continuarão a impedir a validação de novos TSGs no futuro.

Com todas essas reservas em mente, podemos, contudo, afirmar algumas generalizações sobre genes supressores de tumor que provavelmente resistirão ao teste do tempo. Para começar, o nome que aplicamos a tais genes é, em certo sentido, errado. Seu papel normal é suprimir o aumento no número de células, ou por suprimir proliferação ou por disparar apoptose. Na sua ausência, células sobrevivem e proliferam em hora e lugar em que sua sobrevivência e proliferação são inapropriadas (veja, por exemplo, a Figura 7.32).

Outra generalização é também óbvia, mesmo sem se conhecer as identidades de todos os TSGs: os produtos protéicos de genes supressores de tumor não formam qualquer rede de sinalização integrada. Em vez disso, essas proteínas aparecem aqui e ali nos diagramas de regulação operando em diferentes partes da célula. Isso é explicado pelo simples e óbvio raciocínio com o qual começamos este capítulo: todos os sistemas de controle bem-desenhados possuem tanto positivos quanto negativos componentes reguladores que contrabalançam um ao outro. Assim, para todo tipo de sinal positivo, como aqueles sinais que passam por rotas de sinalização mitogênicas, deve haver controladores negativos assegurando que esses fluxos de sinalização sejam mantidos dentro de limites apropriados. Talvez biólogos do câncer deveriam ter deduzido isso de conceitos primários, muito antes da pesquisa com genes supressores de tumor começar na bancada do laboratório. Nesse sentido, é lamentável que eles não tenham consultado engenheiros elétricos e aqueles que dominam as complexidades de circuitos de controle eletrônico e de cibernética. Tais pessoas poderiam ter predito a existência de genes supressores de tumor há muito tempo.

Mesmo depois que 50 genes supressores de tumor sejam catalogados, as proteínas pRb e p53 continuarão a ser reconhecidas como os produtos de genes supressores de tumor de proeminente importância na patogênese de tumores humanos. As razões para isso aparecerão nos próximos dois capítulos. Ainda sem ter todas as evidências em mãos, parece muito provável que as duas rotas de sinalização controladas por pRb e p53 estejam des-

reguladas na grande maioria dos cânceres humanos. Quase todos os genes supressores de tumor restantes (veja a Tabela 7.1) estão envolvidos no desenvolvimento de subconjuntos circunscritos de tumores humanos.

O fato de que certos genes supressores de tumor estão ausentes entre os genes expressos em células de câncer incentivou muitos a propor o óbvio: se pudéssemos substituir os genes

Barra lateral 7.10 Recombinação homóloga permite reestruturar linhagem germinativa de camundongo O processo natural de recombinação homóloga pode ser explorado para introduzir mudanças genéticas bem-definidas na linhagem germinativa de camundongo. Um fragmento de gene clonado introduzido por eletroporação ou microinjeção em uma célula somática ou célula-tronco embrionária (ES) é capaz – com baixa, mas significativa frequência – de recombinar-se com seqüências de DNA homólogas residindo no DNA cromossômico dessa célula. O uso de marcadores de seleção apropriados, nesse caso *neo^r* (para gene de resistência à neomicina) e *tk^{HSV}* (gene da timidina cinase de herpesvírus, o qual torna as células sensíveis à morte pela droga ganciclovir), pode ser explorado para selecionar as células raras nas quais recombinação homóloga ocorreu (Figura 7.31A). Assim, aplicação de neomicina seleciona células que integraram estávelmente o DNA doado em seus cromossomos, enquanto ganciclovir causa morte de células de retiveram *tk^{HSV}* e, portanto, integraram o DNA doado por recombinação não-homóloga com o DNA cromossômico da célula-tronco embrionária (ES) (Figura 7.31B).

Células ES que adquiriram o DNA clonado via recombinação homóloga podem então ser introduzidas via microinjeção na **blastociste** de um **blastocisto** de camundongo (um embrião jovem), e o embrião pode ser então in-

troduzido em uma fêmea **falsa-grávida** (Figura 7.31C). Como células ES são **pluripotentes** (capazes de diferenciar-se em todos os tipos de células no corpo), as células injetadas podem então inserir-se (**quimerizar**) nos tecidos em desenvolvimento do embrião resultante, criando um mosaico genético no qual algumas das células e tecidos são descendentes das células ES injetadas, enquanto outras derivam do blastocisto embrionário hospedeiro. No evento em que essas células ES geneticamente modificadas geram descendentes que quimerizaram as gônadas em desenvolvimento, as células germinativas nas gônadas de adultos resultantes podem transmitir o alelo experimentalmente alterado para organismos descendentes.

O fragmento de DNA doado originalmente usado pode conter seqüências que, após recombinação com o gene cromossômico, destroem a função deste, sendo tal procedimento chamado “**nocaute gênico**”. Alternativamente, outros tipos de alterações podem ser introduzidos nesse fragmento de DNA doado clonado previamente à microinjeção. Após recombinação homóloga, o gene almejado pode reter alguma função e expressar, por exemplo, uma forma mutante da proteína que ele normalmente expressa ou mesmo uma proteína estranha; a introdução de tais seqüências novas no gene residente com frequência é chamada “**knock-in gênico**”.

Figura 7.31 Recombinação homóloga de genes de linhagem germinativa de camundongo (A) Um fragmento clonado de um gene de camundongo ligado, usando procedimentos de DNA recombinante, com os marcadores de seleção de drogas *neo^r* e *tk^{HSV}*. O marcador *neo^r* seleciona células que adquiriram estávelmente o segmento de DNA clonado, enquanto o marcador *tk^{HSV}* seleciona negativamente células que adquiriram o fragmento de DNA clonado por recombinação não-homóloga. Esse fragmento de DNA clonado pode então ser introduzido via eletroporação ou transfecção em uma célula-tronco embrionária (ES) de camundongo. (B) Seleção por drogas pode ser realizada para selecionar células ES que adquiriram estávelmente o fragmento de DNA clonado e o fizeram via recombinação

supressores de tumor ausentes em células cancerosas, estas células seriam revertidas parcial ou totalmente para um fenótipo de célula normal, e o problema do câncer seria amplamente resolvido. Tais estratégias de “terapia gênica” têm o atrativo adicional de que a ocasional e inadvertida introdução de um gene supressor de tumor em uma célula normal deveria ter pouco efeito, se tivesse algum, caso esse gene fosse expresso em níveis fisiológicos; isso reduz o risco de indesejada toxicidade colateral em tecidos normais.

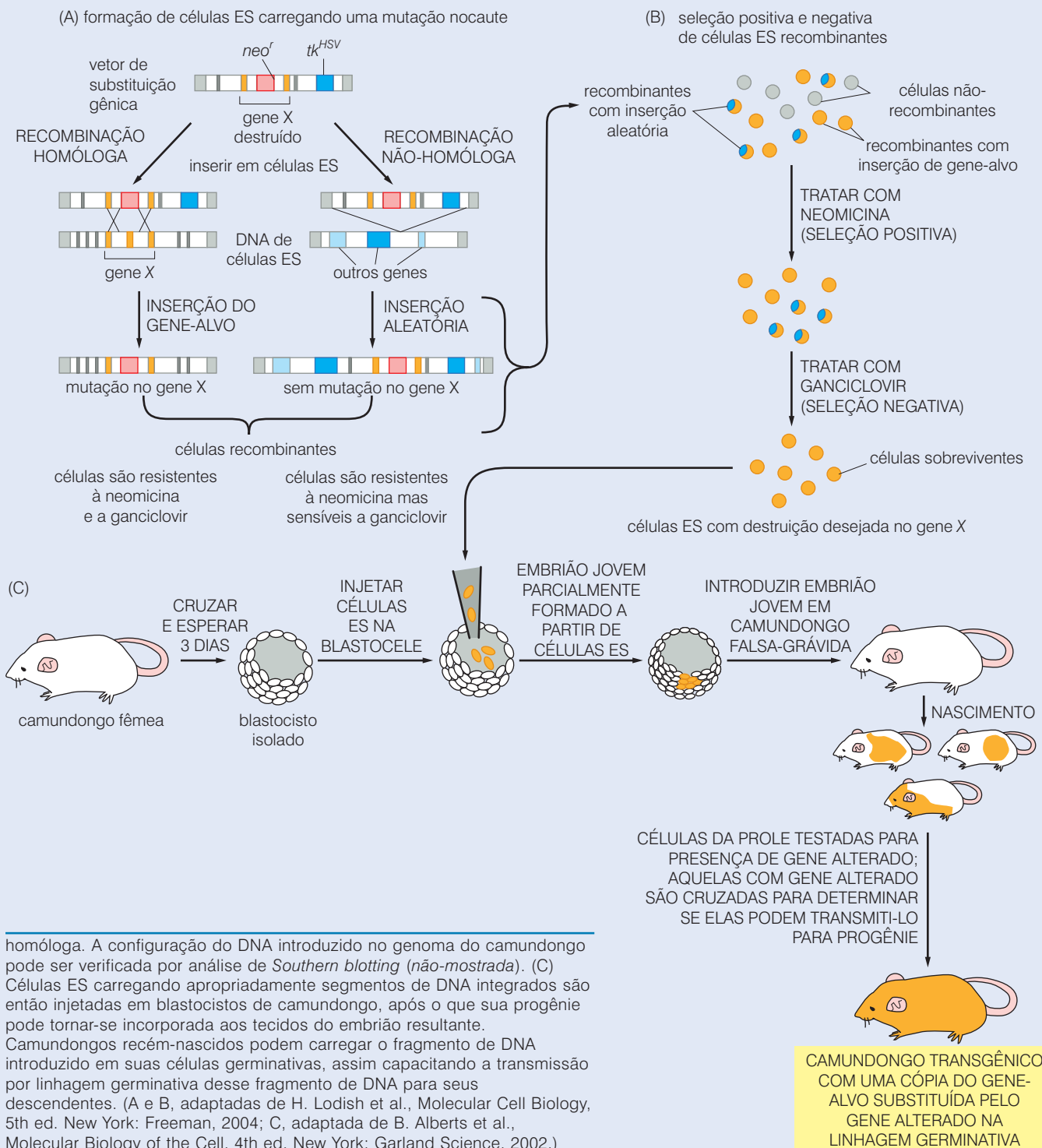
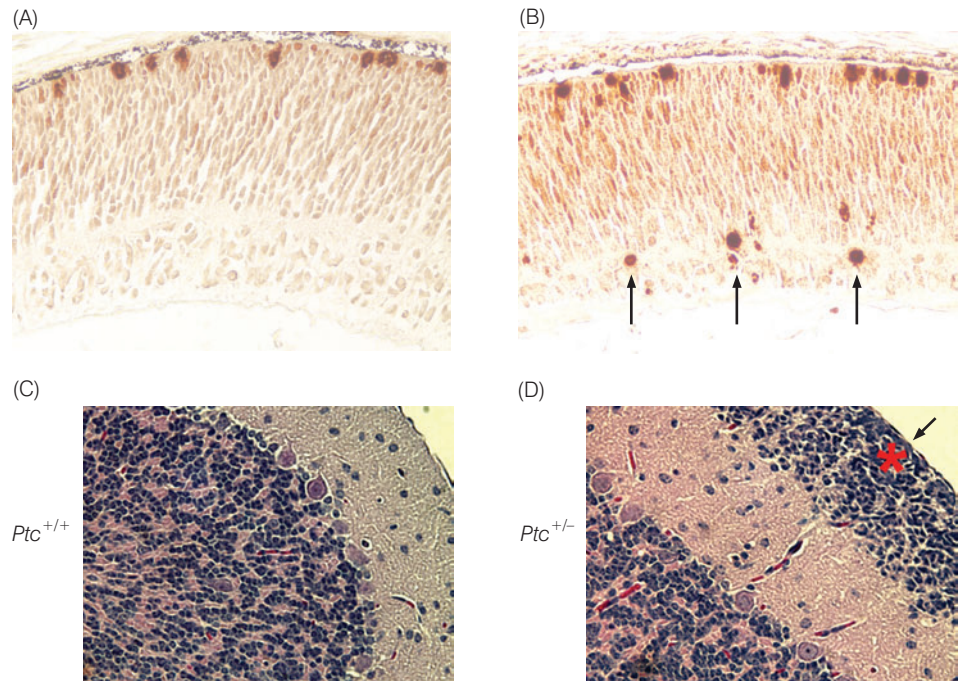


Figura 7.32 pRb e o encerramento de proliferação durante diferenciação. A presença ou ausência de um gene supressor de tumor pode ter efeitos profundos no controle de proliferação celular e, assim, em desenvolvimento de tecido. (A) Durante desenvolvimento normal no camundongo, a proliferação de células precursoras retiniais é limitada às camadas superiores da retina em desenvolvimento (*pontos marron-escuro*), enquanto as células previamente formadas nas camadas inferiores entram em estados diferenciados pós-mitóticos. Neste caso, proliferação é detectada pelo uso de um anticorpo que detecta uma forma de histona H3 que está presente apenas em células proliferativas. (B) Em um camundongo geneticamente alterado, entretanto, no qual ambas as cópias do gene *Rb* foram desativadas seletivamente na retina, células no nível mais baixo da retina em desenvolvimento, que deveriam tornar-se pós-mitóticas, continuam a proliferar e falham na diferenciação apropriada (*setas*). Células similares na retina humana são presumivelmente as precursoras de retinoblastomas. (C) As células granulares (*púrpura-escuro*) do cerebelo em desenvolvimento migram das camadas mais externas (*direita*) para camadas internas do cerebelo (*esquerda*) durante desenvolvimento normal de um camundongo tipo selvagem, neste caso um que tem duas cópias tipo selvagem do gene supressor de tumor *Patched* (*Ptc*); estas células então entram em um estado pós-mitótico. (D) No entanto, em um heterozigoto *Ptc*^{+/-}, muitas das células granulares persistem na camada externa do tecido em desenvolvimento (*seta*, *asterisco vermelho*) e continuam a proliferar; tais células podem tornar-se precursoras de meduloblastomas, o mais comum tumor cerebral pediátrico em humanos. (A e B, de D. MacPherson et al., *Genes Dev.* 18:1681-1694, 2004; C e D, de T.G. Oliver et al., *Development* 132:2425-2439, 2005.)



Essas estratégias de terapias gênicas são tão difíceis de implantar quanto atrativas em conceito. Os vetores virais que formam o centro da maioria de tais procedimentos são ineficientes na entrega de cópias tipo selvagem intactas de genes supressores de tumor a células neoplásicas em massas de tumor. Entretanto, a transferência eficiente dessas cópias tipo selvagem de genes supressores de tumor em todas as células em uma população de células tumorais é essencial para terapias antitumorais curativas: se números significativos de células falham em adquirir um gene supressor de tumor trazido por vetor, essas células servirão como progenitoras de uma nova massa tumoral. Por essa razão, enquanto genes supressores de tumor são profundamente importantes para nosso entendimento de formação de câncer, na maioria dos casos uma redução desse conhecimento em prática terapêutica está ainda muito além do nosso alcance.

As exceções a esse geralmente desanimador cenário vêm dos exemplos em que a ausência de função supressora de tumor torna células vulneráveis a tipos particulares de drogas de baixo peso molecular (que são mais efetivas em alcançar células ao longo do tumor). Por exemplo, durante o curso da progressão de tumor, certas classes de células tumorais tornam-se especialmente dependentes de sinais que são criados pela perda de função de genes supressores de tumor. Assim, a perda do gene supressor de tumor PTEN leva à hiperatividade de Akt/PKB, da qual alguns tipos de tumor dependem para sua viabilidade continuada. Isso explica porque drogas que desligam um co-ativador a montante de Akt/PKB, chamado mTOR, são promissoras como agentes terapêuticos contra tumores, como glioblastomas e carcinomas de próstata, nos quais atividade de PTEN é geralmente perdida. Mas em geral, como veremos no Capítulo 16, os maiores avanços na descoberta de drogas e terapia anticâncer estão no desligamento de oncoproteínas hiperativas. É possível apenas esperar que nosso extensivo conhecimento de função supressora de tumor sirva como a base para tratamentos anticâncer desenvolvidos no futuro mais distante – um tempo em que nossas habilidades em lançar novas terapias serão muito mais sofisticadas do que agora.

Conceitos-chave

- Em nível celular, o fenótipo de câncer é geralmente recessivo (com a exceção de oncogenes virais, os quais agem de uma maneira dominante). Isso indica que a perda de informação genética é responsável por pelo menos parte do fenótipo celular cancerígeno.

- Muito da perda de informação genética funcionalmente importante é atribuída à perda de genes supressores de tumor (TSGs), que são freqüentemente presentes nos genomas de células de câncer como alelos inativos inúteis.
- Como consequência, a perda de genes supressores de tumor em geral afeta o fenótipo de células apenas quando ambas as cópias de tais genes são perdidas na célula.
- A perda de função de TSG pode ocorrer ou por mutação genética ou pelo silenciamento epigenético de genes via metilação de promotor.
- Inativação, (por mutação ou metilação) de uma cópia de um TSG pode ser seguida por outros mecanismos que facilitam perda da outra cópia gênica; esses mecanismos dependem da perda de heterozigiosidade (LOH) no loco TSG e podem envolver recombinação mitótica, perda de uma região cromossômica que porta o gene, segregação cromossômica inapropriada (não-disjunção) ou conversão gênica oriunda de uma troca na fita molde durante replicação de DNA.
- Eventos de LOH em geral ocorrem com mais freqüência do que mutações ou metilação de promotor, e ocorrem em diferentes freqüências em genes diferentes.
- LOH repetida ocorrendo em uma dada região cromossômica em vários tumores surgidos independentemente em geral indica a presença de um TSG nessa região.
- TSGs regulam proliferação celular por muitos mecanismos bioquímicos. O único tema que os une é o fato de que a perda de cada um deles aumenta a probabilidade de uma célula sofrer transformação neoplásica.
- Quando cópias mutantes defectivas de um TSG são herdadas na linhagem germinativa, o resultado é freqüentemente suscetibilidade muito aumentada a um ou outro tipo específico de câncer.
- TSGs são geralmente chamados *gatekeepers* para mostrar seu envolvimento em governar a dinâmica de proliferação celular e distingui-los de uma segunda classe de genes, os *caretakers*, que também aumentam risco de câncer quando herdados na forma defectiva, mas funcionam de maneira totalmente diferentemente, uma vez que trabalham para manter a integridade do genoma da célula.
- A perda de TSGs pode ocorrer muito mais freqüentemente durante o desenvolvimento de um tumor do que a ativação de proto-oncogenes em oncogenes.

Questões elaboradas

1. Por que a herança de oncogenes mutantes ativados é responsável por apenas uma pequena proporção de síndromes de cânceres familiares, enquanto a herança de genes supressores de tumor (TSGs) defectivos é responsável pela maior parte dessas doenças?
2. Que fatores podem determinar se uma inativação de um TSG ocorre a uma freqüência por geração celular maior do que a ativação de um oncogene?
3. Como pode a perda de função de TSG produzir uma consequência que é, ao nível biológico, indistinguível da aquisição de um oncogene ativo?
4. Alguns TSGs sofrem LOH em menos de 20% dos tumores de um certo tipo. Por que e como tais baixas taxas de LOH complicam a identificação e o isolamento molecular de tais genes?
5. Que critérios precisam ser satisfeitos antes de você sentir-se seguro para categorizar um gene como um TSG?
6. Que fatores podem influenciar as identidades dos tecidos afetados por alelo defectivo herdado de um TSG?

Leitura adicional

- Baylin SB & Herman JG (2000) DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics. *Trends Genet.* 16, 168–174.
- Baylin SB, Herman JG, Graff JR, et al. (1998) Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia. *Adv. Cancer Res.* 72, 141–196.
- Bienz M & Clevers H (2000) Linking colorectal cancer to Wnt signaling. *Cell* 103, 311–320.
- Cichowski K & Jacks T (2001) NF1 tumor suppressor gene function: narrowing the GAP. *Cell* 104, 593–604.
- Comings DE (1973) A general theory of carcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70, 3324–3328.
- Fearon ER (1997) Human cancer syndromes: clues to the origin and nature of cancer. *Science* 215, 252–259.

- Feinberg AP & Tycko B (2004) The history of cancer epigenetics. *Nat. Rev. Cancer* 4, 143–153.
- Fodde R, Smits R & Clevers H (2001) APC, signal transduction and genetic instability in colorectal cancer. *Nat. Rev. Cancer* 1, 55–67.
- Gregoriuff A & Clevers H (2005) Wnt signaling in the intestinal epithelium: from endoderm to cancer. *Genes Dev.* 19, 877–890.
- Herman JG & Baylin SB (2003) Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N.E.J. Med.* 349, 2042–2054.
- Hershko A, Ciechanover A & Varshavsky A (2000) The ubiquitin system. *Nat. Med.* 6, 1073–1081.
- Jones PA & Baylin SB (2002) The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat. Rev. Genet.* 3, 415–428.
- Jones PA & Takai D (2001) The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. *Science* 293, 1068–1070.
- Kern SE (2002) Whose hypothesis? Ciphering, sectorials, D lesions, freckles and the operation of Stigler's Law. *Cancer Biol. Ther.* 1, 571–581.
- Koch CA, Vortmeyer AO, Zhuang Z et al. (2002) New insights into the genetics of chromaffin cell tumors. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 970, 11–28.
- Kondo K & Kaelin WG Jr (2001) The von Hippel–Lindau tumor suppressor gene. *Exp. Cell Res.* 264, 117–125.
- Laird PW (2003) The power and promise of DNA methylation markers. *Nat. Rev. Cancer* 3, 253–266.
- Lustig B & Behrens J (2003) The Wnt signaling pathway and its role in tumor development. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 129, 199–221.
- Marsh DJ & Zori RT (2002) Genetic insights into familial cancers—update and recent discoveries. *Cancer Lett.* 181, 125–164.
- Moon RT, Kohn AD, De Ferrari GV & Kaykas A. (2004) Wnt and β -catenin signaling: diseases and therapies. *Nat. Rev. Genet.* 5, 689–699.
- Nelson WJ & Nusse R (2004) Convergence of Wnt, β -catenin, and cadherin pathways. *Science* 303, 1483–1487.
- Ponder BA (2001) Cancer genetics. *Nature* 411, 336–341.
- Pugh CW & Ratcliffe PJ (2003) The von Hippel–Lindau tumor suppressor, hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) degradation, and cancer pathogenesis. *Sem. Cancer Biol.* 13, 83–89.
- Sherr CJ (2004) Principles of tumor suppression. *Cell* 116, 235–246.
- Shtiegman K & Yarden Y (2003) The role of ubiquitylation in signaling by growth factors: implications to cancer. *Sem. Cancer Biol.* 13, 29–40.
- Tischfield JA and Shao C (2003) Somatic recombination redux. *Nat. Genet.* 33, 5–6.
- Vogelstein B & Kinzler KW (1998) The genetic basis of human cancer. New York: McGraw-Hill.
- Voges D, Zwickl P & Baumeister W (1999) The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu. Rev. Biochem.* 68, 1015–1068.
- Wijnhoven SW, Kool, HJ, van Teilingen, CM et al. (2001) Loss of heterozygosity in somatic cells of the mouse. An important step in cancer initiation? *Mutat. Res.* 473, 23–36.
- Zhu Y and Parada LF (2001) Neurofibromin, a tumor suppressor in the nervous system. *Exp. Cell Res.* 264, 19–28.



CAPÍTULO 8

pRb e o Controle do Relógio do Ciclo Celular

“Isso imediatamente leva a perguntar: se os *loci* (de transformação celular hipotética) podem envolver-se em tamanho prejuízo, por que mantê-los? A resposta lógica é que eles têm algumas funções necessárias durante algum estágio do ciclo celular ou algum estágio da embriogênese.”

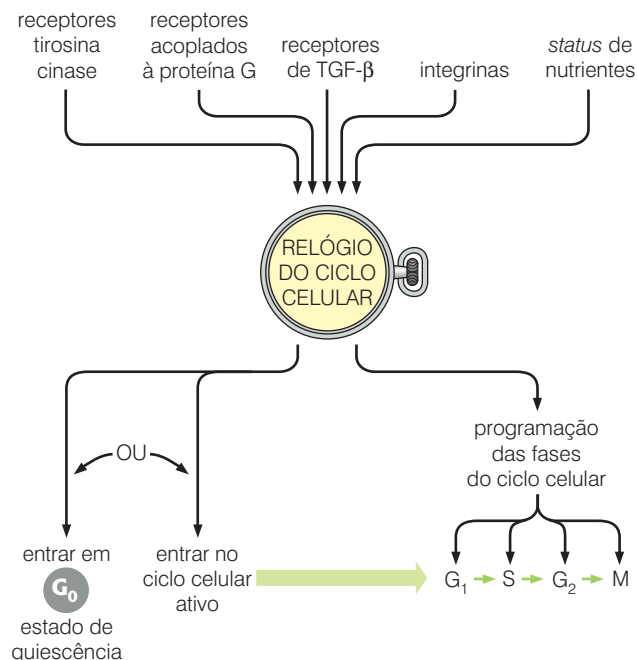
David E. Comings, geneticista, 1973.

O destino das unidades celulares é ditado pelos sinais que cada uma delas recebe de seus arredores – um aspecto repetidamente enfatizado em capítulos anteriores neste livro. Assim, quase todos os tipos de células normais não proliferarão a menos que sejam induzidas a fazê-lo por fatores de crescimento mitogênicos. Outras proteínas sinalizadoras, como o fator de crescimento transformante β (TGF- β), podem rejeitar as mensagens carregadas por fatores mitogênicos e forçar a interrupção da proliferação. Além disso, sinais extracelulares podem persuadir a célula a adentrar um estado diferenciado, **pós-mitótico**, do qual ela nunca retornará para continuar proliferando.

Esses sinais desiguais são coletados por dúzias de diferentes receptores de superfície e depois convertidos em complexos circuitos de processamento de sinais que operam predominantemente no citoplasma celular. De alguma forma, essa mistura de sinais deve ser processada, integrada e finalmente desdobrada em decisões simples, de ordem binária, a serem tomadas pelas células e que estabelecem se elas devem proliferar ou tornar-se quiescentes e, enquanto quiescentes, se deverão diferenciar-se ou não. Esse tipo de comportamento sugere a existência de um governador centralizado que opera dentro da célula – uma central de controle que recebe uma grande variedade de sinais e toma as decisões concernentes ao destino da célula.

Esse governador é conhecido: trata-se do **relógio do ciclo celular**, que opera no núcleo. O termo é equivocado, pois o sistema não age contando o tempo. A despeito disso, o

Figura 8.1 O governador central do crescimento e proliferação. O termo “relógio do ciclo celular” denota um circuito molecular operando no núcleo da célula que processa e integra uma variedade de sinais aferentes (sinais que chegam) que se originam fora e dentro da célula e que decidem se a célula deve entrar no ciclo celular ativo ou recuar, assumindo um estado não-proliferativo. Caso decida-se pela proliferação ativa, este circuito procede com o objetivo de programar a complexa seqüência de alterações bioquímicas da célula a fim de permitir a ela duplicar seu conteúdo e dividir-se em duas células-filhas.



utilizaremos aqui por falta de uma melhor designação. Mais do que apenas contar o tempo, o relógio do ciclo celular é uma rede de proteínas em constante interação – um circuito de processamento de sinais – que recebe sinais de várias fontes originárias dos ambientes intra e extracelulares, integra-os e, a partir disso, decide o destino da célula. Se o relógio do ciclo celular decide em favor da proliferação, ele orquestra complexas transições que, em conjunto, constituem o ciclo celular de crescimento e divisão. Se, por outro lado, a decisão favorecer a condição de quiescência, o relógio do ciclo celular usa seus agentes para impor um estado não-proliferativo sobre a célula (Figura 8.1).

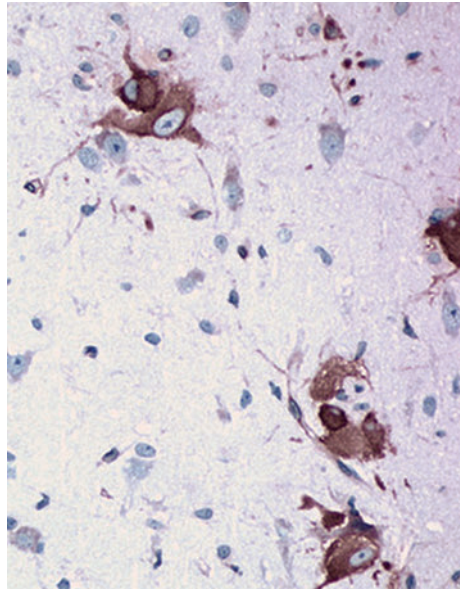
O comportamento proliferativo das células cancerosas indica que o “governador” do destino da célula é influenciado não apenas por proteínas normais, mas também por proteínas codificadas por oncogenes que se inserem em várias rotas de sinalização e rompem os mecanismos normais de controle celular. Da mesma forma, a deleção de proteínas supressoras do desenvolvimento de tumores promove alterações profundas no comportamento da célula e perturba as decisões do relógio do ciclo celular. Conseqüentemente, mais cedo ou mais tarde, as ações moleculares da maior parte dos oncogenes e genes supressores de tumores devem ser explicadas em termos de seus efeitos no relógio do ciclo celular. Com esse objetivo, devotaremos a primeira metade deste capítulo a uma descrição de como essa máquina molecular opera em condições de normalidade e, depois, procederemos ao estudo de como ela é perturbada em células humanas cancerosas.

8.1 Sinais externos influenciam a decisão de uma célula de entrar no ciclo celular ativo

Quando colocadas em cultura sob condições que estimulam a multiplicação segundo um padrão exponencial, células de mamíferos exibem um complexo ciclo de crescimento e divisão que é geralmente chamado de **ciclo celular**. Uma célula que foi recentemente gerada pelos processos de divisão celular – **mitose** e **citocinese** – deve decidir, logo após, se iniciará um novo ciclo de crescimento ativo e divisão ou recuará ao estado de não-crescimento, chamado G₀. Como descrito anteriormente (Seções 5.1 e 6.1), tal decisão é muito influenciada por fatores de crescimento mitogênicos provenientes dos arredores da célula. Sua presença em condições suficientes encorajará a célula recentemente gerada por mitose a permanecer no ciclo ativo de crescimento e divisão; em contrapartida, sua ausência levará a célula a proceder da mitose à fase G₀, o estado de quiescência.



(A)



(B)

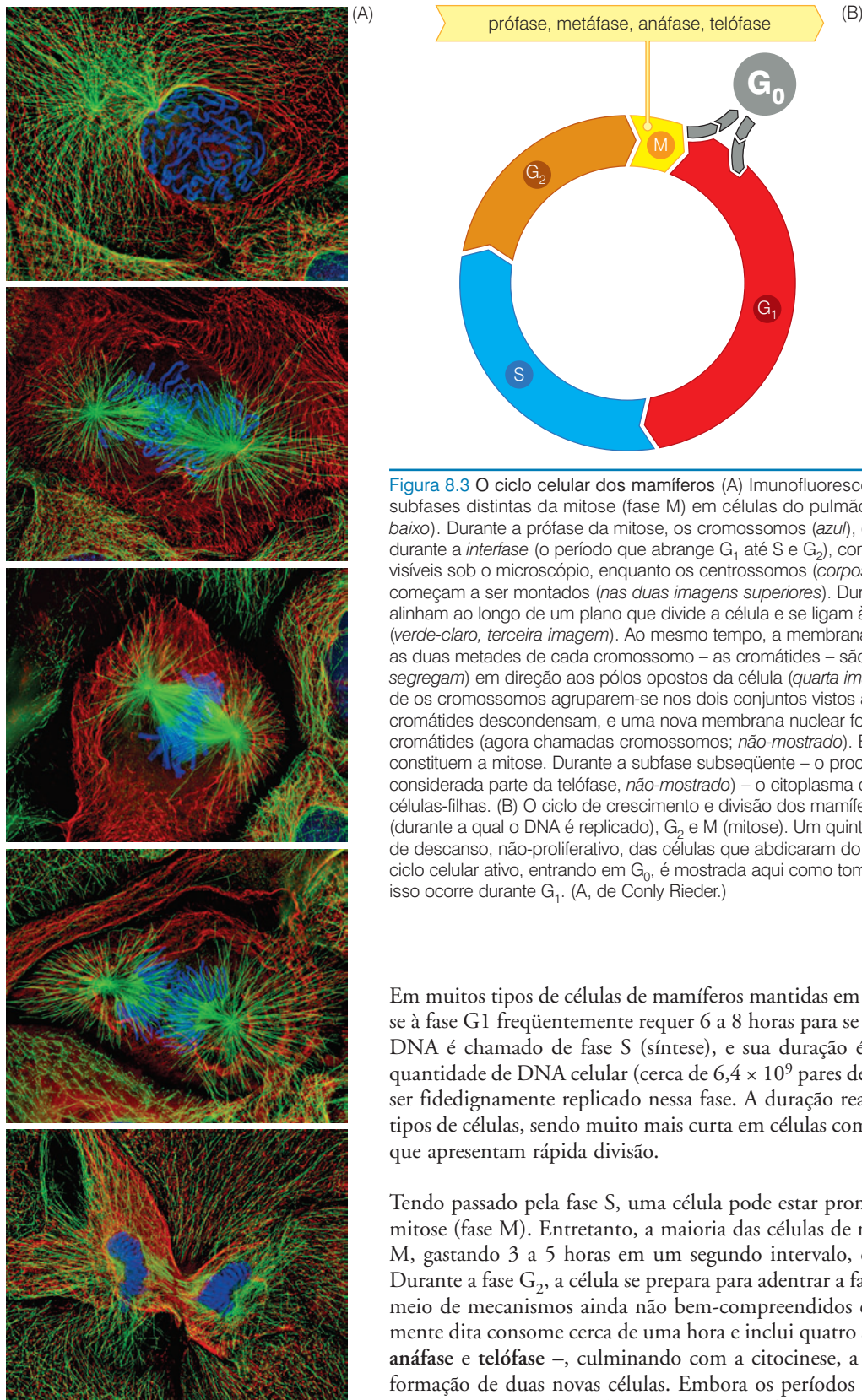
Figura 8.2 Crescimento versus proliferação

Alterações em certas proteínas sinalizadoras, como aquela codificada pelo gene supressor de tumor *TSC1*, permitem aos processos de crescimento celular e divisão serem separados um do outro. (A) Nesta micrografia de microscopia eletrônica de varredura do olho de uma *Drosophila*, as células da omatidia da porção superior do olho foram desprovidas do gene ortólogo do *TSC1* da mosca; essas células são fisicamente maiores que as células selvagens mostradas (abaixo), porque estas cresceram mais durante os ciclos celulares que levaram à sua formação. (B) O mesmo comportamento pode ser visto nos cérebros de pacientes sofrendo de esclerose tuberosa, na qual a função de *TSC1* foi perdida por meio de uma mutação da linhagem germinativa e subsequente perda somática de heterozigose. Vistas aqui estão as células gigantes presentes em um crescimento benigno (uma "tuberosidade"). As células gigantes (marrom) estão marcadas com um anticorpo contra a S6 fosforilada, uma proteína ribossomal importante na regulação da síntese protéica e, por conseguinte, no crescimento celular; fosforilação e ativação funcional de S6 é desregulada em células privadas da função de *TSC1*. (A, de X. Gao e D. Pan, *Genes Dev.* 15:1383-1392, 2001; B, cortesia de J.A. Chan e D.J. Kwiatkowski.)

A saída do ciclo celular pode ser ativamente induzida pela presença de fatores inibidores do crescimento no meio de cultura. Destacando-se dentre esses fatores antimitogênicos, encontra-se o TGF- β . A saída do ciclo celular e entrada na fase de quiescência G_0 , se decorrente da ausência de fatores de crescimento mitogênicos ou da presença de fatores antimitogênicos como o TGF- β , é frequentemente reversível no sentido de que o encontro de uma célula no estado quiescente com um fator de crescimento mitogênico pode induzir essa célula a reentrar na fase de crescimento ativo e divisão. Entretanto, algumas células saindo do ciclo celular ativo podem fazê-lo irreversivelmente, assim desistindo de todas as opções de reentrarem na fase de crescimento e divisão, sendo designada como célula *pós-mitótica*. Por exemplo, neurônios no cérebro são amplamente enquadrados nessa categoria.

A decisão de uma célula recentemente gerada por divisão celular de permanecer no estado ativo de crescimento e divisão requer que ela comece a preparar-se imediatamente para a próxima divisão. Tais preparações envolvem, dentre outras coisas, a duplicação de seus constituintes macromoleculares para assegurar que duas células-filhas resultantes do próximo ciclo de divisão celular receberão uma dotação adequada. Esse acúmulo de constituintes celulares, que leva a um aumento do tamanho celular, é algumas vezes chamado de processo de *crescimento* celular, para distinguir do processo de *divisão* celular, que gera, por meio da mitose e da citocinese, duas células-filhas a partir de uma célula-mãe (veja a Figura 8.2). Entretanto, como rotina e no decorrer deste livro, o termo "crescimento celular" implicará ambos, o acúmulo de constituintes celulares e a subsequente divisão celular, ou seja, os dois processos que juntos levam à proliferação celular.

O acúmulo de macromoléculas pela célula envolve, entre muitas outras moléculas, a duplicação do genoma. Em muitas células procarióticas, essa duplicação – o processo de replicação do DNA – começa imediatamente após a formação das células-filhas pela divisão celular. Entretanto, na maioria das células de mamíferos, o programa de síntese de macromoléculas é organizado de forma muito diferente. Enquanto o acúmulo de RNA e proteínas é iniciado imediatamente após a divisão celular e procede continuamente até a próxima divisão, a tarefa de duplicação do DNA é adiada por várias horas (frequentemente 12 a 15) após a geração de novas células-filhas a partir de mitose e citocinese. Durante esse período entre o nascimento de uma célula-filha e o subsequente início da síntese do DNA, chamado fase G_1 (fase de intervalo 1) do ciclo celular (Figura 8.3), as células tomam decisões críticas sobre crescimento *versus* quiescência e se, enquanto quiescentes, elas vão sofrer diferenciação.



Em muitos tipos de células de mamíferos mantidas em cultura, a síntese do DNA que segue-se à fase G_1 frequentemente requer 6 a 8 horas para se completar. Esse período de síntese do DNA é chamado de fase S (síntese), e sua duração é determinada em parte pela enorme quantidade de DNA celular (cerca de $6,4 \times 10^9$ pares de bases por genoma diplóide) que deve ser fidedignamente replicado nessa fase. A duração real da fase S varia muito em diferentes tipos de células, sendo muito mais curta em células como as células embrionárias e linfócitos, que apresentam rápida divisão.

Tendo passado pela fase S, uma célula pode estar pronta para entrar diretamente na fase de mitose (fase M). Entretanto, a maioria das células de mamíferos retarda sua entrada na fase M, gastando 3 a 5 horas em um segundo intervalo, chamado G_2 , antes de entrar em M. Durante a fase G_2 , a célula se prepara para adentrar a fase de mitose (M) e divisão celular por meio de mecanismos ainda não bem-compreendidos em sua totalidade. A fase M propriamente dita consome cerca de uma hora e inclui quatro subfases distintas – **prófase**, **metáfase**, **anáfase** e **telófase** –, culminando com a citocinese, a divisão do citoplasma que permite a formação de duas novas células. Embora os períodos relacionados anteriormente caracterizem o comportamento de células de mamíferos estudadas em cultura, eles não refletem o comportamento de todos os tipos de células expostas a todas as condições. Por exemplo, linfócitos em franca proliferação podem duplicar seu número em cinco horas, algumas células de um embrião jovem podem fazê-lo ainda mais rapidamente.

Assim como na fase S, a fase M deve transcorrer com grande precisão. A fase M inicia-se com as duas fitas de DNA recentemente duplicadas em cada cromossomo; isso ocorre nas *cromátides* irmãs do cromossomo, que encontram-se alinhadas adjacientemente no núcleo. Durante a mitose, a alocação das duas novas cromátides às duas células-filhas deve ocorrer com precisão para assegurar que cada filha receba exatamente um complemento diplóide de cromátides. Uma vez presentes nos núcleos das recém-separadas células-filhas, essas cromátides tornam-se seus cromossomos.

Isso significa que o conteúdo genético transferido para cada célula-filha depende da execução precisa de dois processos: a replicação fidedigna do genoma celular durante a fase S e a apropriada alocação do DNA duplicado às células-filhas durante a fase M. Como será discutido a seguir, anormalidades nesses processos podem ter consequências desastrosas para a célula e o organismo – dentre elas, o câncer.

Como ocorre em qualquer mecanismo, a máquina que executa as várias etapas do ciclo celular está predisposta a falhas em seu funcionamento. Essa possibilidade de falha contrasta com a exigência das células de ter as várias etapas do seu ciclo celular ocorrendo à prova de erros. Por isso, a célula dispõe de uma série de mecanismos de vigia que se ocupam do monitoramento de cada etapa da progressão do ciclo celular e permitem a essa célula prosseguir até a próxima etapa do ciclo somente se um pré-requisito for satisfatoriamente completado. Além disso, se etapas específicas na execução do processo não ocorrerem propriamente, esses mecanismos de monitoramento rapidamente impedem a célula de prosseguir no ciclo celular até que tais problemas sejam satisfatoriamente manejados. Além desses, outros sistemas de monitoramento asseguram que, uma vez completada uma etapa específica do ciclo celular, ela não será repetida até que a célula passe ao próximo ciclo celular. Esses mecanismos de monitoramento são designados **pontos de verificação** ou **controles do ponto de verificação** (Figura 8.4).

Um ponto de verificação assegura que a célula não avançará de G_1 para S se o genoma necessita de reparo. Outro ponto de verificação, operando em S, desacelerará ou introduzirá uma pausa no processo de replicação em resposta a dano ao DNA (em células de mamíferos,

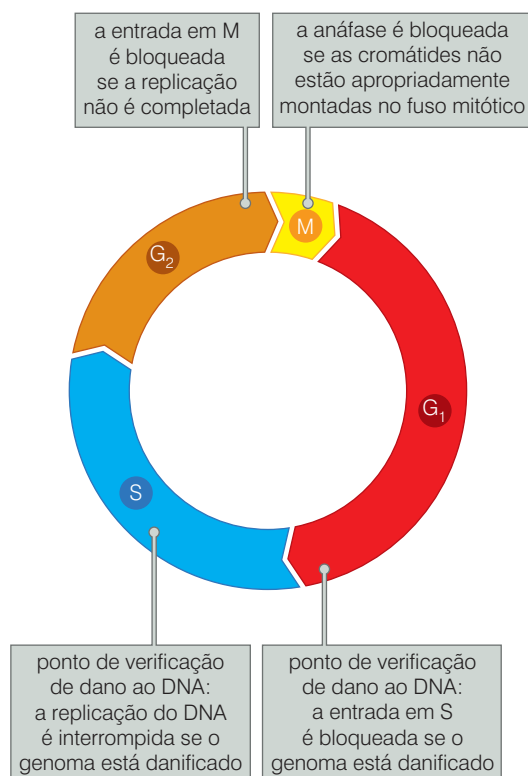


Figura 8.4 Exemplos de pontos de verificação no ciclo celular. Os pontos de verificação impõem um controle de qualidade para assegurar que a célula tenha completado apropriadamente todos os requisitos de uma fase do ciclo celular antes de ser autorizada a avançar para a próxima fase. A uma célula, não será permitido entrar na fase S até que todas as etapas de G_1 tenham sido completadas. A célula será impedida de entrar em G_2 até que todo o seu DNA cromossômico tenha sido propriamente replicado. Similarmente, não é permitido a uma célula entrar na anáfase (quando as cromátides pareadas são separadas) até que todos os seus cromossomos tenham sido apropriadamente montados no fuso mitótico durante a metáfase. Além disso, não é permitido a uma célula avançar na fase S ou M se seu DNA foi danificado e ainda não sofreu reparo. Outros controles (*não-mostrados*) asseguram que, uma vez que uma etapa específica do ciclo celular tenha sido completada, ela não se repetirá até o próximo ciclo celular.

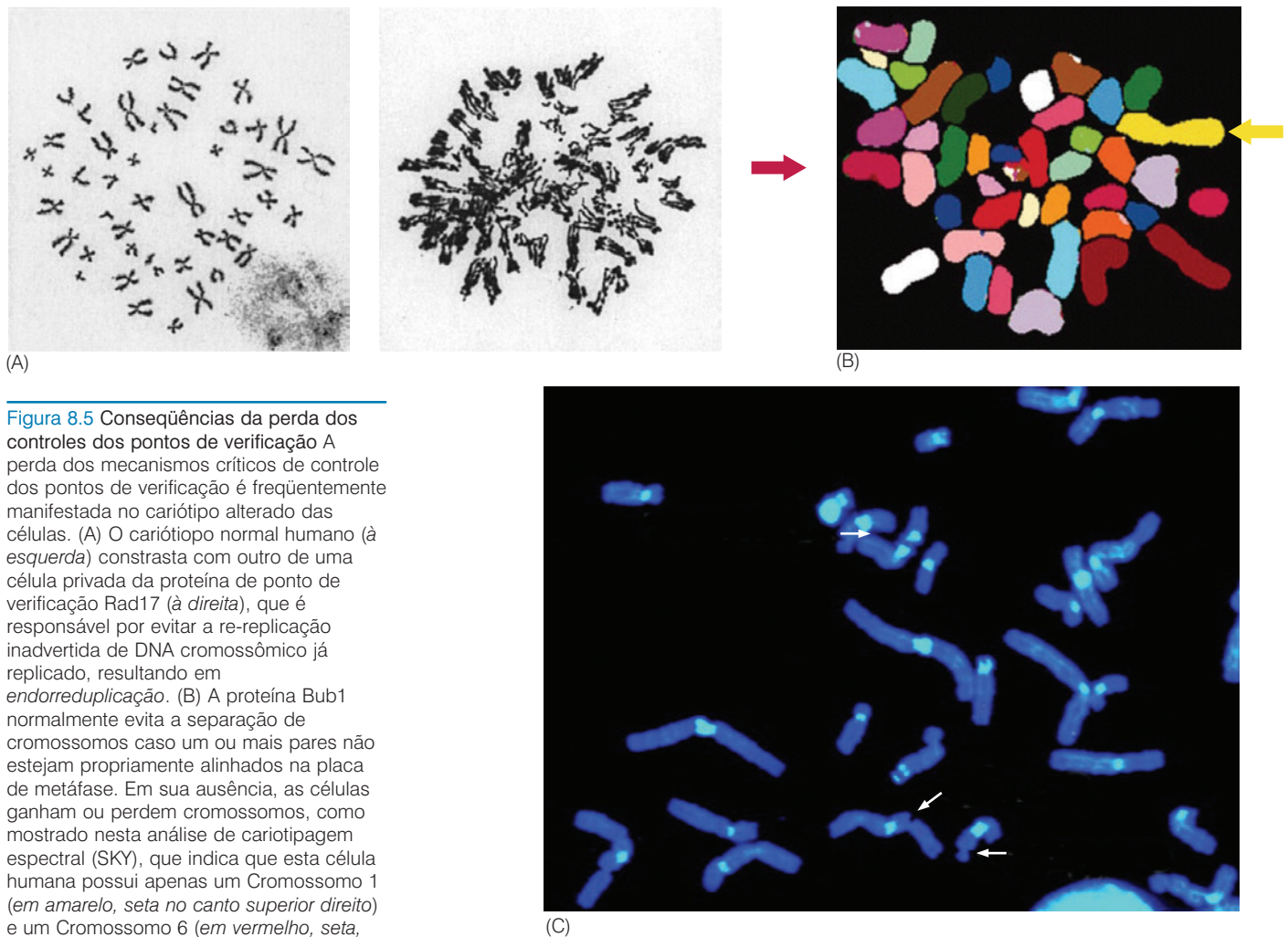


Figura 8.5 Consequências da perda dos controles dos pontos de verificação. A perda dos mecanismos críticos de controle dos pontos de verificação é frequentemente manifestada no cariótipo alterado das células. (A) O cariótipo normal humano (à esquerda) contrasta com outro de uma célula privada da proteína de ponto de verificação Rad17 (à direita), que é responsável por evitar a re-replicação inadvertida de DNA cromossômico já replicado, resultando em *endorreduplicação*. (B) A proteína Bub1 normalmente evita a separação de cromossomos caso um ou mais pares não estejam propriamente alinhados na placa de metáfase. Em sua ausência, as células ganham ou perdem cromossomos, como mostrado nesta análise de cariotipagem espectral (SKY), que indica que esta célula humana possui apenas um Cromossomo 1 (em amarelo, seta no canto superior direito) e um Cromossomo 6 (em vermelho, seta, centro, à esquerda). (C) Dentre outras funções, a proteína cinase ATR (ataxia-telangectasia e proteína relacionada à Rad3) é responsável por interromper a replicação do DNA até que forquilha de replicação paradas sejam reparadas. Em sua ausência, sítios frágeis no cromossomo – quebras em certos sítios do cromossomo – tornam-se visíveis sob análise de cariotipagem. Nesta figura, sítios frágeis nos Cromossomos humanos 3 e 16 (setas brancas) são aparentes em células em que a ATR não se encontra funcional. (A, de X. Wang et al. *Genes Dev.* 17:965-970, 2003; B, de A. Musio et al., *Cancer Res.* 63:2855-2863; C, de A.M. Casper et al., *Am. J. Hum. Genet.* 75:654-660, 2004.)

isso pode causar uma duplicação do tempo necessário para completar a síntese de DNA). Um terceiro ponto de verificação só permitirá à célula prosseguir de G_2 para M se a replicação ocorrida em S tiver sido completada. Dano ao DNA desencadeará outro controle de ponto de verificação que bloqueia a entrada em M. Durante a fase M, controladores de pontos de verificação de alta eficiência bloqueiam a anáfase; esse bloqueio somente é removido após todos os cromossomos terem sido propriamente ligados ao fuso mitótico. Um outro ponto de verificação não citado aqui tem sido reportado: por exemplo, um ponto de verificação de **decatenação** no final de G_2 evita a entrada em M até que o par de fitas de DNA replicado em S tenha sido desenredado. Defeitos em alguns desses pontos de verificação podem ser observados devido a seus efeitos nos cromossomos (Figura 8.5).

As operações desses pontos de verificação também influenciam a formação de cânceres. À medida que um tumor desenvolve-se (progressão tumoral, discutida no Capítulo 11), células cancerosas incipientes beneficiam-se da experimentação com várias combinações e permutações de alelos mutantes a fim de determinar qual lhes permitirá maior vantagem proliferativa. Um aumento nas mutações de seus genomas acelera a taxa na qual podem adquirir combinações vantajosas de alelos e, com isso, apressar a corrida da progressão do tumor. A capacidade de passar por mutações e a resultante instabilidade genômica é incompatível com a progressão normal do ciclo celular, uma vez que os controles de pontos de verificação geralmente bloqueiam o avanço da célula pelo ciclo celular se o DNA estiver danificado ou seus cromossomos estiverem desordenados. Assim, somado à aquisição de genes de controle de crescimento alterados (ativação de oncogenes e inativação de genes supressores

de tumores), muitos tipos de células cancerosas têm um ou mais de seus controles de pontos de verificação desativados. Com esses controles relaxados, células cancerosas incipientes podem acumular mais rapidamente os genes mutantes e os cariótipos alterados que propulsionam seu crescimento neoplásico. A ruptura dos controles responsáveis pela manutenção do genoma da célula em um estado intacto é um dos principais temas do Capítulo 12.

8.2 Células decidem entre crescimento e quiescência durante um período específico na fase G_1

Como já mencionado, é provável que virtualmente todas as células normais no corpo venham a requerer sinais externos, a exemplo daqueles transmitidos por fatores de crescimento mitogênicos, antes de começarem a crescer e dividir. As únicas exceções à regra parecem ser células embrionárias, as quais parecem ser capazes de proliferar sem receber sinais especificamente estimuladores de crescimento (Barra lateral 8.1). A explicação para esse comportamento observado em células normais nos nossos tecidos é uma só: como essas células participam da formação de tecidos precisamente estruturados, sua proliferação deve, necessariamente, ser coordenada com células adjacentes nesses tecidos. Em outras palavras, o corpo não pode dar a cada uma das suas quase 10^{14} células a licença para decidir por si próprias entre crescer e dividir-se. Se isso acontecesse, teríamos o caos.

Evidências acumuladas durante o último quarto de século indicam que as células consultam o seu ambiente extracelular e seus respectivos sinais de regulação do crescimento durante uma discreta janela de tempo durante o ciclo celular, mais especificamente do início e maior parte do curso da fase G_1 , terminando até uma hora ou duas antes da transição de G_1 para S (Figura 8.6). As operações da maquinaria da fase G_1 são indicadas pelas respostas de células em cultura a sinais extracelulares. Se removêssemos o soro e, com isso, os fatores de crescimento das células antes de elas completarem 80 a 90% da fase G_1 , elas falhariam em prosseguir pelo ciclo celular e provavelmente reverteriam para a fase G_0 . Entretanto, tendo essas células transitado por esse período de tomada de decisão da fase G_1 e avançado em direção às horas finais de tal fase (os 10 a 20% remanescentes de G_1), a remoção do soro não mais as afetaria, e elas continuariam progredindo pelas fases G_1 , S, G_2 e M. Da mesma maneira, fatores antimitogênicos, como o TGF- β , são capazes de impor seus efeitos de inibição de crescimento somente neste período, do início até a metade da fase G_1 . Tendo a célula entrado na fase tardia de G_1 , ela parece “esquecer” da presença desse fator de regulação negativa em seus arredores.

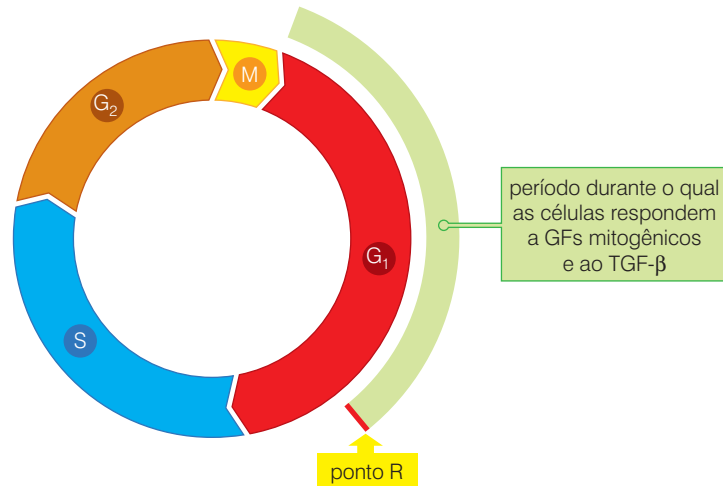
Esse quadro de dependência total de fatores de crescimento extracelulares seguido pela entrada em estágios tardios de G_1 em um estado de relativa independência indica que uma importante decisão deve ser tomada nesse ponto. Precisamente nesse ponto, uma célula deve deci-

Barra lateral 8.1 Células-tronco embrionárias apresentam um comportamento autônomo Nossas percepções sobre o comportamento de células de mamíferos normais têm sido fundamentadas por décadas de trabalho com ampla variedade de células somáticas presentes em tecidos embrionários e adultos. Entretanto, células do embrião jovem operam claramente sob um jogo de normas distinto. A rota da pRb e a maquinaria do relógio do ciclo celular a serem descritas neste capítulo parecem ser operantes em uma ou outra forma em virtualmente todos os tipos de células adultas. Em contraste, vários experimentos indicam que o controle de crescimento imposto pela pRb não é funcional em células embrionárias iniciais, incluindo aí seus derivados em cultura, as células-tronco embrionárias (ES). O mesmo pode ser dito sobre a rota da p53 (veja o Capítulo 9). Parece que os sinais mitogênicos requeridos para manter células mais diferenciadas proliferando não são necessários por células ES em cultura para sua proliferação. Por exemplo, além do

fator de crescimento chamado LIF (fator inibidor da leucemia), que é necessário para evitar sua diferenciação, ES de camundongos proliferando *in vitro* parecem ser capazes de dirigir sua própria proliferação por meio de sinais gerados intracelularmente. (De fato, uma proteína semelhante à Ras constitutivamente ativada, chamada E-Ras, é expressa especificamente nessas células.)

Células ES parecem preservar muito do comportamento autônomo que associamos a ancestrais unicelulares dos metazoários, isto é, o comportamento de células que ainda não se tornaram dependentes de seus vizinhos para a obtenção dos sinais que controlam crescimento e sobrevivência. A indicação mais chocante de sua autonomia extrema é sua habilidade em formar tumores benignos (**teratomas**) quando introduzidos em muitos sítios anatômicos em um organismo adulto. Como essas células são geneticamente do tipo selvagem, elas representam o único exemplo de uma célula tipo selvagem que é tumorigênica.

Figura 8.6 A resposta a sinais extracelulares durante o ciclo celular. As células respondem a mitógenos extracelulares e fatores inibitórios (como o TGF- β) somente durante uma discreta janela de tempo que começa no início de G_1 e termina antes de seu final. O final dessa janela de tempo é designado ponto de restrição (R), que indica o ponto no tempo em que a célula deve comprometer-se a avançar pelo ciclo celular até a fase M, permanecer em G_1 ou sair do ciclo celular ativo, recuando para G_0 .



dir se permanecerá em G_1 , se recuará do ciclo ativo para G_0 ou se avançará pela fase tardia de G_1 e daí para as outras fases do ciclo. Essa decisão crítica é tomada em uma fase de transição que foi chamada **ponto de restrição** ou **ponto R** (veja a Figura 8.6). Na maioria das células de mamíferos estudadas até hoje, o ponto R ocorre várias horas antes da transição das fases G_1/S .

Se uma célula deve decidir no ponto R a continuar avançando pelo ciclo de crescimento e divisão, ela compromete-se a prosseguir além de G_1 para a fase S e daí para completar uma série de etapas rigidamente programadas (a totalidade das fases S, G_2 e M) que lhe permitirão sua divisão em duas células-filhas. Tal decisão será respeitada mesmo que fatores de crescimento estejam ausentes do meio extracelular durante essas fases remanescentes do ciclo celular. Sabemos que a série de etapas posteriores (S, G_2 e M) prossegue de acordo com um cronograma fixo porque uma célula que entra em S irá, na ausência de um desastre maior, invariavelmente completar S e, tendo isso ocorrido, prosseguir para G_2 e daí para M.

Para aqueles especificamente interessados na proliferação descontrolada das células cancerosas, esse programa fixo é pouco atraente, pois a progressão da etapa final de G_1 e daí às outras fases, isto é, S- G_2 -M, ocorre de forma similar em células normais e cancerosas. Interessados em estudar o câncer direcionam-se predominantemente à transição de G_0/G_1 e ao período único na vida de uma célula em franco crescimento ativo – a janela de tempo envolvendo a maior parte de G_1 – quando a célula é dada a licença de decidir sobre seu destino.

O comprometimento de avançar pelo ponto R e continuar direto à fase M não é absoluto, como se pode esperar. Desastres metabólicos, genéticos ou físicos podem interferir durante S, G_2 ou M e forçar a célula a interromper, com frequência temporariamente, seu avanço através do ciclo celular até que as condições tenham sido normalizadas. Ainda assim, na grande maioria dos casos, as células logram seu intento de evitar tais desastres. Isso faz do ponto R um determinante crítico de se as células vão crescer ou não. Um crescente número de evidências indica que a desregulação da maquinaria de controle do ponto R acompanha a formação da maioria, senão de todos, dos tipos de células cancerosas. Outros pontos decisórios nas etapas tardias de G_1 também podem contribuir para o descontrole na proliferação de certas células cancerosas.

8.3 Ciclinas e cinases dependentes de ciclinas constituem os componentes centrais do relógio do ciclo celular

A existência do ponto R nos deixa com duas questões principais que tomarão a maior parte deste capítulo para serem explicadas. Primeiro, qual é a natureza da maquinaria

molecular que decide se uma célula em G_1 continuará a avançar pelo ciclo celular ou sairá deste, passando a um estado de não-crescimento? Segundo, como essa maquinaria, que chamamos de relógio do ciclo celular, implementa essas decisões uma vez que elas tenham sido tomadas? Começaremos pela segunda questão antes de passarmos à primeira.

Como previamente descrito (Capítulos 5 e 6), quando sinais são transmitidos de uma única proteína controladora mestra a vários alvos respondentes *downstream* a ela, as funções de emissão de sinais são delegadas a proteínas cinases. Essas enzimas são idealmente apropriadas para a tarefa. Por meio da fosforilação de alvos múltiplos e diversos, isto é, substratos, uma cinase pode criar modificações covalentes que servem para ligar ou desligar várias atividades inerentes a esses substratos protéicos. De fato, o relógio do ciclo celular vale-se de um grupo de proteínas cinases para executar as várias etapas da progressão do ciclo celular. Por exemplo, a fosforilação das proteínas associadas ao **centrossomo** na transição G_1/S permite sua duplicação em preparação para a fase M. A fosforilação de outras proteínas previamente à fase S permite a ativação de sítios de replicação do DNA ao longo do cromossomo. A fosforilação de histonas em antecipação às fases S e M confere à cromatina configurações que permitem a essas duas fases progredirem normalmente. E a fosforilação de proteínas que formam a membrana nuclear (algumas vezes denominada *envelope nuclear*), como laminina e nucleoporina, causa sua dissociação e dissolução dessa membrana no início da fase M.

As cinases disponibilizadas pela maquinaria do ciclo celular são coletivamente chamadas **cinases dependentes de ciclinas** (CDKs), para indicar que estas enzimas nunca agem por conta própria; em vez disso, elas dependem de subunidades regulatórias associadas, as proteínas **ciclinas**, para funcionamento adequado. Complexos biomoleculares de CDKs e suas ciclinas parceiras são responsáveis por enviar os sinais do relógio do ciclo celular para dúzias, senão centenas, de moléculas de resposta que executam o trabalho de conduzir a célula através de seu ciclo de crescimento e divisão.

As CDKs são serina/treonina cinases, em contraste com tirosinas cinases que estão associadas a receptores para fatores de crescimento e a moléculas de cinase não-receptoras, como Src. As CDKs apresentam cerca de 40% de identidade da sequência de aminoácidos entre si e são portanto consideradas uma subfamília distinta dentro da grande (cerca de 430) multidão de serinas/treoninas cinases codificadas pelo genoma humano. As ciclinas associadas a CDKs ativam a atividade catalítica de suas parceiras CDKs (Figura 8.7). (No bem-estudado exemplo da ligação da ciclina A a CDK2, a associação das duas proteínas aumenta a atividade enzimática da CDK2 400 mil vezes!). Ao mesmo tempo, as ciclinas servem como guia para as CDKs, por meio do auxílio aos complexos ciclina-CDK no reconhecimento de substratos protéicos na célula. As ciclinas, por sua parte, também constituem uma família distinta de proteínas celulares que têm em comum um resíduo de cerca de 100 aminoácidos que está envolvido na ligação e ativação funcional das CDKs.

Na verdade, são os complexos ciclina-CDK que constituem o motor do relógio do ciclo celular. Durante a maior parte da fase G_1 do ciclo celular, duas CDKs de atividade similar, a CDK4 e a CDK6, são guiadas e dependem de sua associação com um trio de proteínas relacionadas (D1, D2 e D3), que coletivamente são chamadas ciclinas do tipo D (Figura 8.8). Após o ponto R na fase tardia de G_1 , as ciclinas tipo E (E1 e E2) associam-se à CDK2 para permitir a fosforilação de substratos apropriados requeridos para a entrada na fase S. À medida que as células adentram a fase S, as ciclinas tipo A (A1 e A2) substituem as ciclinas tipo E como parceiras da CDK2 e assim permitem a progressão da fase S (Figura 8.7). Mais tarde na fase S, as ciclinas tipo A trocam de parceiras, deixando CDK2 e associando-se a outra CDK, chamada CDC2 ou CDK1 (usaremos CDC2). À medida que a célula segue pelo ciclo celular, adentrando a fase G_2 , as ciclinas tipo A são substituídas como parceiras de CDC2 pelas ciclinas tipo B (B1 e B2). Finalmente, no início da fase M, os complexos formados entre CDC2 e ciclinas tipo B desencadeiam vários eventos da prófase, anáfase e telófase que, em conjunto, constituem o complexo programa de mitose.

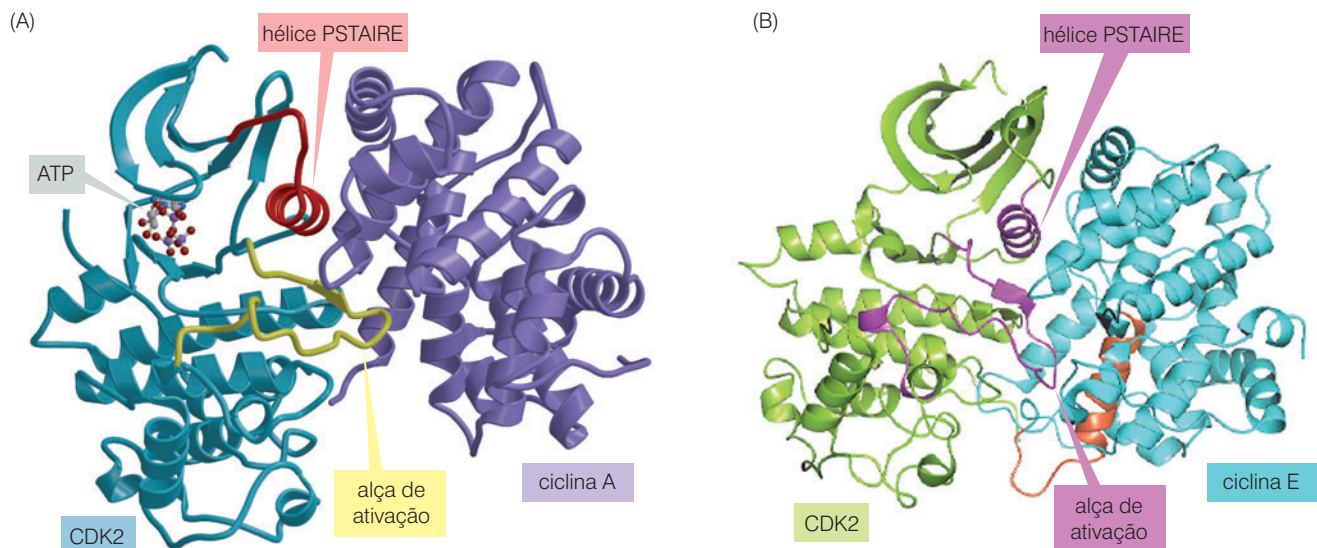


Figura 8.7 Complexos ciclina-CDK. Análise por meio de cristalografia de raios X revelaram as estruturas dos complexos ciclina-cinases dependentes de ciclinas (CDK), como estes formados pela CDK2 com dois de seus parceiros alternativos, as ciclinas A e E. Em cada caso, a ciclina ativa a molécula CDK por meio de mudanças estereoquímicas no sítio catalítico da CDK e dirige o complexo cataliticamente ativado a substratos apropriados para fosforilação. (A) A alfa hélice PSTAIRE (vermelho) está presente em todas as CDKs e é essencial para a ligação das ciclinas. A alça de ativação (amarelo), por vezes chamada "alça T", deve ser fosforilada em uma treonina por uma cinase

ativadora de CDK (CAK) para que a função catalítica de uma CDK seja ativada. A ciclina A (roxo) direciona CDK2 (verde azulado) a substratos que devem ser fosforilados a fim de que a fase S prossiga. (B) Durante a fase tardia de G_1 do ciclo celular, a ciclina E dirige a CDK2 para substratos protéicos que devem ser fosforilados em preparação à entrada na fase S. A conservada hélice α PSTAIRE e a alça de ativação de CDK2 são mostradas aqui na cor púrpura. Outro segmento (cor-de-laranja) está envolvido, de formas não-esclarecidas, com a associação da ciclina E com os centrôssomos. (A, de P.D. Jeffrey et al. *Nature* 376:313-320, 1995; B, de R. Honda et al., *EMBO J.* 24:452-463, 2005.)

Assim como em outros sistemas bem-regulados, as atividades de vários complexos ciclina-CDK devem ser moduladas a fim de que se imponha controle sobre etapas específicas do ciclo celular. A forma mais importante de se obter tal regulação reside na mudança dos níveis, bem como na disponibilidade das ciclinas durante as várias fases do ciclo celular. Em contraste ao que ocorre com as ciclinas, os níveis da maioria das CDKs varia muito pouco.

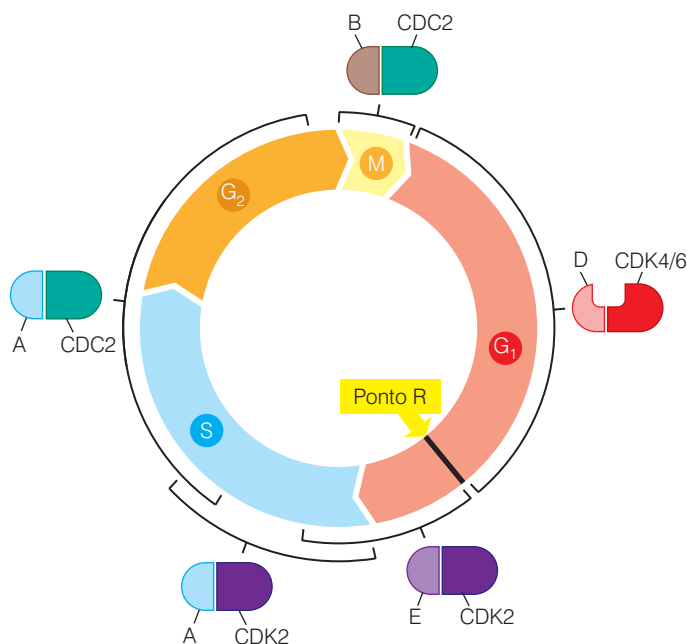
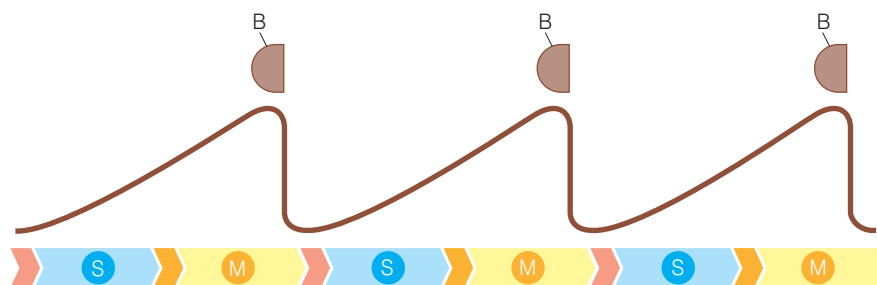


Figura 8.8 Pareamento de ciclinas com cinases dependentes de ciclinas. Cada tipo de par de ciclina combina-se com uma cinase dependente de ciclina (CDK) específica, ou jogo de CDKs. As ciclinas tipo D (D1, D2 e D3) ligam-se a CDK4 ou CDK6, a ciclina tipo E (E1 e E2) liga-se à CDK2, a ciclina tipo A (A1 e A2) liga-se a CDK2 ou CDC2 e as ciclinas tipo B (B1 e B2) ligam-se à CDC2. Os períodos durante o ciclo celular em que esses vários complexos ciclina-CDK estão ativos estão indicados.



As primeiras evidências a respeito das ciclinas e do controle de CDKs vieram de estudos dos reguladores de mitose em embriões jovens de rãs e ouriço-do-mar. Esses experimentos mostraram que os níveis de ciclinas tipo B aumentam antes da mitose, permitindo a elas e ao CDC2 formarem complexos que iniciam a entrada na fase M. No final da fase M, os níveis de ciclinas B despencam devido à vida curta dessa proteína, que sofre degradação. No início do próximo ciclo celular, a ciclina B é virtualmente não-detectável nas células e acumula-se gradualmente mais tarde no ciclo, antes da próxima fase M. Todas as células no embrião passam pelas fases S e M simultaneamente, uma vez que o processo de crescimento e divisão de todas as células nesses embriões jovens ocorre de maneira **sincronizada**, isto é, coordenadamente. Isso acarreta episódios repetidos de variação nos níveis dessas proteínas ciclinas, fato que originou seu nome (Figura 8.9).

As dramáticas variações da ciclina B observadas nas diferentes fases do ciclo celular ocorrem também com outras ciclinas. Os níveis da ciclina E aumentam abruptamente após uma célula ter passado pelo ponto R e, em contrapartida, diminuem quando a célula entra na fase S (Figura 8.10), ao passo que a ciclina A aumenta quando da entrada na fase S. Embora existam pelo menos dois subtipos de ciclinas A, B e E, nos referiremos a eles apenas como ciclina A, B e E, respectivamente, pois os subtipos correspondentes de cada uma parecem operar de maneira idêntica.

O colapso nos níveis de várias espécies de ciclinas à medida que as células avançam de uma fase do ciclo celular para outra ocorre devido à sua rápida degradação. Esse processo é mediado pela ativação de ubiquitinas ligases que são altamente coordenadas e que ligam cadeias de poliubiquitinas a tais ciclinas. Como descrito na Barra lateral 7.8, essa poliubiquitinação leva à degradação proteolítica nos proteassomos. O acúmulo gradual das ciclinas seguido pela sua rápida degradação tem importantes consequências funcionais para o ciclo celular, pois esse processo determina o sentido único do ciclo celular. Isso assegura, por exemplo, que células que acabaram de deixar a fase M não possam retornar à mesma fase do ciclo, mas somente avançar em direção a G_1 , S e G_2 até que estas acumulem as ciclinas B necessárias para a entrada, uma vez mais, na fase M.

A única exceção a essas bem-programadas variações nos níveis de ciclinas é representada pelas ciclinas tipo D. Os níveis das ciclinas A, B e E não variam dinamicamente durante o avanço entre as várias fases de crescimento e divisão celular. Em vez disso, os níveis de ciclinas tipo D são bastante controlados por sinais extracelulares, especificamente aqueles transportados por

Figura 8.9 Flutuações nos níveis da ciclina B dependentes do ciclo celular As flutuações cíclicas nos níveis da ciclina B no girino e em embriões de pepinos do mar deram às ciclinas seu nome. Essas flutuações são observáveis, pois os ciclos celulares nesses embriões iniciais são sincronizados, ou seja, todas as células adentram a fase M simultaneamente. Nesses embriões iniciais, as fases G_1 e G_2 do ciclo celular (laranja, setas cor-de-rosa) estão virtualmente ausentes, e as células, em consequência, alternam entre as fases M e S. (Apesar dos níveis da ciclina B serem já substanciais antes do início da fase M, moléculas da ciclina B são incapazes de formar complexos B-CDC2 cataliticamente ativos até que ocorra a transição de G_2 para M.)

Figura 8.10 Flutuações dos níveis de ciclina durante o ciclo celular Os níveis da maioria das ciclinas presentes em mamíferos flutuam dramaticamente na medida em que as células progridem através das várias fases do ciclo celular. Para a maioria dessas ciclinas, tais flutuações são rigidamente coordenadas com o cronograma dos avanços através das várias fases do ciclo celular. Entretanto, no caso das ciclinas tipo D, sinais extracelulares, notavelmente aqueles gerados por fatores de crescimento, influenciam seus níveis significativamente. (Enquanto a ciclina D1 – e possivelmente outras ciclinas tipo D – está presente em outras fases do ciclo celular além de G_1 , seguindo-se à transição de G_1 /S, ela é exportada do núcleo para o citoplasma, onde não mais influenciará a progressão do ciclo celular.)

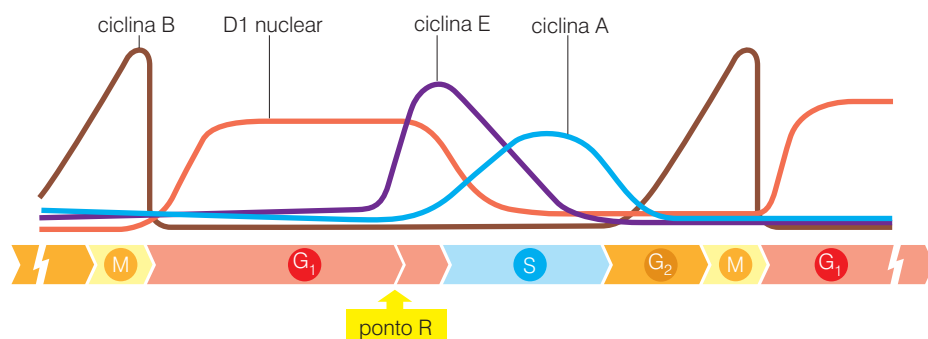
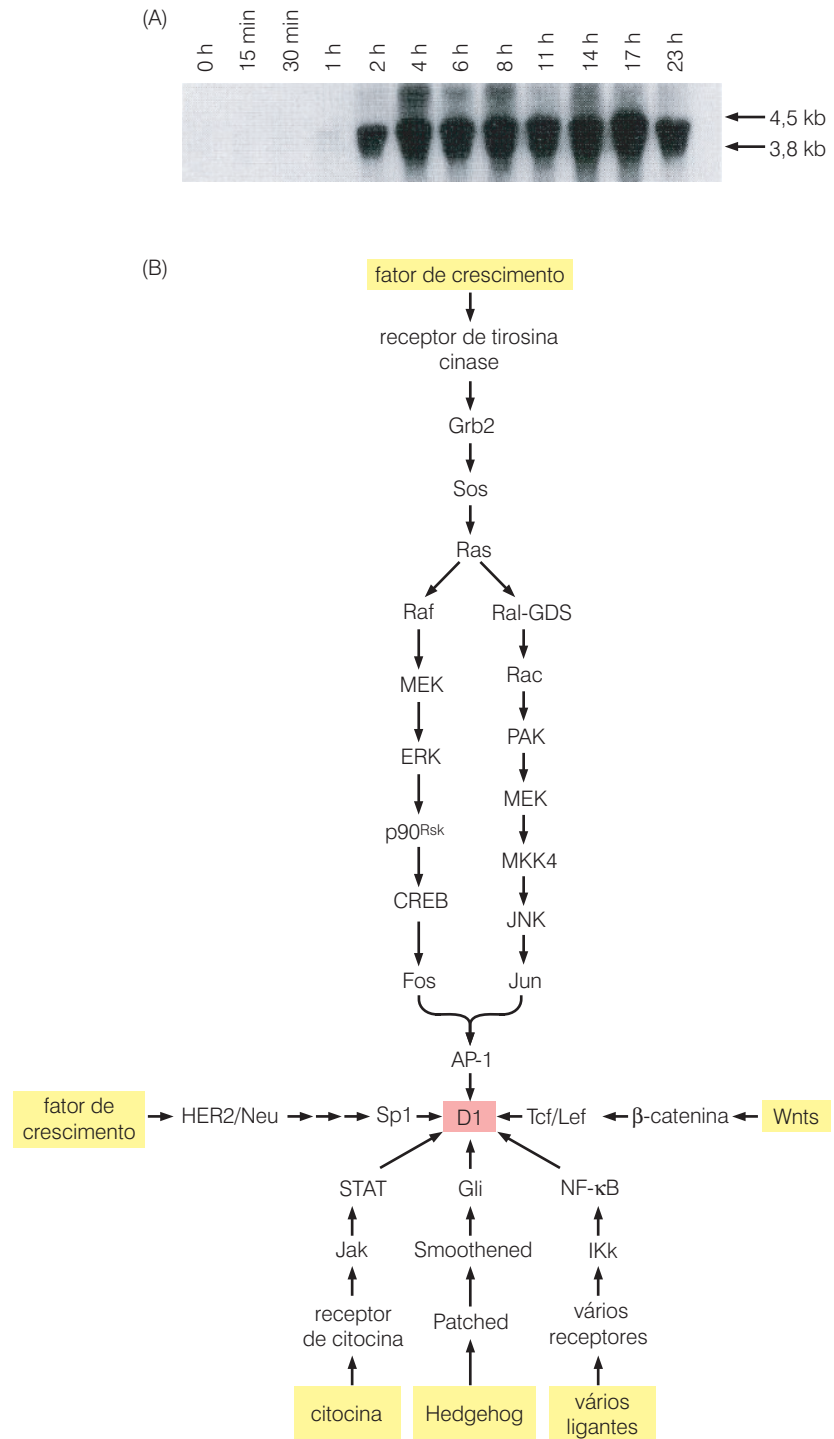


Figura 8.11 Controle dos níveis da ciclina D1 (A) A ciclina D1 foi descoberta como uma proteína cujos níveis são muito induzidos pela exposição de macrófagos ao mitógeno CSF-1 (fator estimulador de colônias-1). Neste caso, uma linhagem de macrófagos que foi mantida sem CSF-1 foi exposta a CSF-1 fresco, e as quantidades de mRNA da ciclina D1 foram determinadas em intervalos de tempo subsequentes por meio de *Northern blot*. (B) O controle dos níveis da ciclina D1 por mitógenos extracelulares pode ser explicado, em parte, por uma cascata de transdução de sinais que parte de receptores para fatores de crescimento (RTKs) até o fator de transcrição AP-1, um dos vários fatores de crescimento que modulam a transcrição do gene da *ciclina D1* no núcleo. Como indicado, várias outras cascatas de sinalização convergem para o promotor desse gene. (A, de H. Matsushime et al., *Cell* 65:701-713, 1991.)



uma variedade de fatores de crescimento mitogênicos. No caso da ciclina D1— a mais estudada das três ciclinas tipo D —, a ativação de receptores do tipo tirosina cinase e a estimulação de várias cascatas de sinalização resulta no rápido acúmulo da ciclina D1 (Figura 8.11). Por outro lado, a remoção de fatores de crescimento do meio de cultura celular resulta em um rápido colapso nos níveis de ciclina D1 com uma meia-vida ($T_{1/2}$) de aproximadamente 30 minutos.

O comportamento variável das ciclinas tipo D tem sido racionalizado da seguinte maneira: elas servem para transportar sinais do meio extracelular para o relógio do ciclo celular ope-

Tabela 8.1 Indução da expressão da ciclina tipo D por sinais extracelulares

Fonte do sinal	Intermediários da sinalização	Tipo de ciclina
Receptor RANK	via NF- κ B	D1
Receptor de prolactina	Jak/STAT	D1
Receptor de estrogênio	AP-1 TF (?)	D1
Cinase de adesão focal		D1
Receptor de HER2/Neu	E2F e Sp1 TFs	D1
Receptor Wnts-Frizzled	β -catenina e Tcf/Lef TFs	D1
Bcr/Abl		D2
Receptor de FSH	AMP cíclico	D2
Vários mitógenos	Myc	D2
Receptor de interleucina-4,7		D2
Receptor de interleucina-5	STAT3/5	D3
	E2A TF	D3

FHS = hormônio foliculo-estimulante.

rante no núcleo. Como os níveis de ciclinas do tipo D flutuam em concordância com os níveis de mitógenos extracelulares, as ciclinas tipo D informam continuamente a maquinaria do ciclo celular sobre as condições do ambiente ao redor da célula.

Após as ciclinas tipo D serem sintetizadas no citoplasma e migrarem para o núcleo, elas são montadas em complexos com dois parceiros alternativos de CDK, o CDK4 e o CDK6. Como estas duas CDKs têm funções semelhantes, nos referiremos a elas como CDK4/6. Os complexos ciclina D-CDK4/6 parecem ter atividade enzimática similar, senão idêntica, bem como especificidade de substrato independente do fato de conter ciclina D1, D2 ou D3.

Essas similaridades invocam uma questão: por que células de mamíferos expressam três ciclinas aparentemente redundantes? O que parece ser uma redundância em verdade oferece à célula uma refinada captação sensorial e maior flexibilidade de resposta. O promotor de cada um dos três genes está sob o controle de um grupo diferente de receptores de superfície (Tabela 8.1). Por exemplo, o promotor do gene da *ciclina D1* (chamado, em humanos, CCND1) tem sítios para a ligação dos fatores de transcrição AP-1, Tcf/Lef e NF- κ B (Figura 8.11B), que, por sua vez, são ativados por uma série de receptores de fatores de crescimento. Em contrapartida, o promotor da *ciclina D2* responde a ativação pelo fator de transcrição Myc e a sinais extracelulares que estimulam aumento na concentração intracelular de adenosina monofosfato cíclica (cAMP). O gene da *ciclina D3* responde a fatores de transcrição STAT3 e STAT5, e estes respondem a receptores de interleucina ativos em várias células hematopoiéticas. O fator de transcrição E2A, que é ativado durante a diferenciação de linfócitos, também controla a expressão da *ciclina D3*.

Essa disposição permite a uma diversa lista de sinais extracelulares afetar as atividades da CDK4/6 por meio do controle dos níveis de seus vários parceiros de ciclinas D. Além disso, investigações mais recentes indicaram que certas ciclinas têm funções na célula que são aparentemente não-relacionadas a seu papel na progressão do ciclo celular (Barra lateral 8.2).

Uma vez formados, os complexos ciclina D-CDK4/6 são capazes de conduzir a célula desde o começo da fase G₁ até, e talvez até após, o ponto R. Após a passagem pelo ponto R, as ciclinas remanescentes – E, A e B – comportam-se de forma pré-programada, executando as etapas do ciclo que começam em R e estendem-se até o fim de M (Figura 8.12). De fato, uma vez tendo passado pelo ponto R, os componentes da maquinaria do ciclo celular assumem autonomia e não mais respondem a sinais extracelulares.

Por razões ainda pouco compreendidas, em fases tardias, os complexos ciclina-CDK suprimem a atividade dos complexos que os precederam em fases anteriores do ciclo celular. Por exemplo, quando a ciclina A é ativada pela ação de complexos ciclina E-CDK2

Barra lateral 8.2 Ciclinas tipo D têm outras funções além do controle do ciclo celular Duas décadas de pesquisa do ciclo celular criaram a impressão de que o controle do ciclo celular é a única função das ciclinas. De fato, a ciclina D1 associa-se ao receptor de estrogênio (ER) e ao fator de transcrição C/EBP β . Ao ligar-se a ER, a ciclina D1 mimetiza a ligação normal ao seu receptor – estrogênio – ao estimular suas atividades transcricionais. A grande maioria (> 70%) dos cânceres de mama expressam o ER, e isso explica os efeitos mitogênicos que o estrogênio exerce sobre as células desses tumores. Como a ciclina D1 está superexpressa na maioria desses tumores e pode ativar esse receptor, os complexos D1-ER podem também exercer um importante papel, levando à proliferação celular em tais tumores. A associação da ciclina D1 com a C/EBP β resulta em uma inibição desse fator de transcrição; acredita-se que essa associação tenha importante papel na programação da diferenciação em vários tipos de células. De fato, o padrão de expressão de genes de vários cânceres de mama oferece clara indicação de que as interações da ciclina D1 com C/EBP β contribuem significativamente para o perfil transcripcional dessas células. Tais associações sugerem que ainda outras interações das ciclinas tipo D com várias proteínas nucleares serão identificadas no futuro.

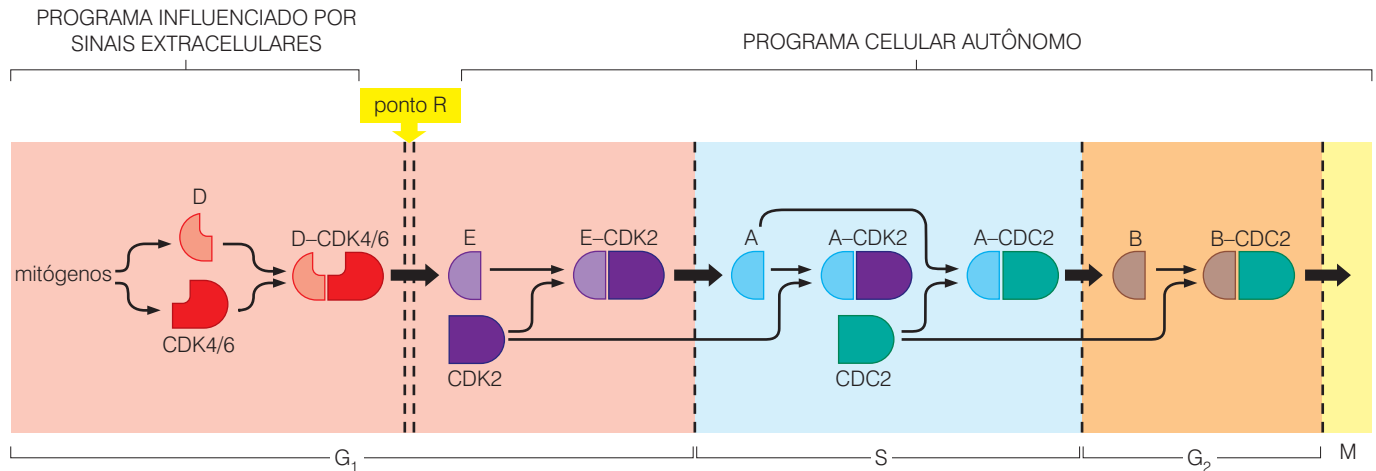


Figura 8.12 Controle dos níveis de ciclina durante o ciclo celular Enquanto sinais extracelulares influenciam robustamente os níveis de ciclinas D1 durante a maior parte da fase G₁ do ciclo celular, os níveis das ciclinas remanescentes são precisamente coordenados com o ciclo celular e controlam seu avanço. Assim, após as ciclinas passarem pelo ponto R e os complexos ciclina-CDK remanescentes ocorrerem seguindo um cronograma previsível que parece ser independente de sinais extracelulares fisiológicos. Em parte, essa coordenação é alcançada porque os complexos ciclina-CDK em uma fase do ciclo celular são responsáveis por ativar outros na fase subsequente (*indicado*) e por desligarem aqueles que estavam ativos na fase anterior (*não-mostrado*).

durante a transição G₁/S, as atividades da ciclina A-CDK2 resultam em, dentre outros achados, inativação do fator de transcrição que serviu anteriormente durante a transição pelo ponto R para induzir a expressão da ciclina E. Na fase tardia de S e início de G₂, o complexo ciclina A-CDC2 começa a se preparar para a ativação dos complexos de ciclinas B-CDC2 necessários para a entrada na fase de mitose. Uma vez que estes últimos sejam ativados, eles parecem causar um desligamento da síntese da ciclina A, e assim sucessivamente.

8.4 Complexos ciclina-CDK também são regulados por inibidores de CDK

O padrão de progressão do ciclo celular descrito anteriormente parte do princípio de que sinais fisiológicos são capazes de influenciar a atividade do relógio do ciclo celular somente por meio da regulação dos níveis de ciclinas. Na verdade, existem vários outros níveis de controle que modulam a atividade dos complexos ciclina-CDK que, conseqüentemente, regulam o avanço pelo ciclo celular.

O mais importante desses controles adicionais é imposto por uma classe de proteínas genericamente chamada de inibidoras de CDK ou simplesmente CdkIs. Até o momento, sete dessas proteínas foram identificadas; elas são capazes de antagonizar a atividade dos complexos ciclina-CDK. Um grupo de quatro dessas, as proteínas INK4 (originalmente chamadas inibidoras de CDK4), são destinadas especificamente a complexos CDK4 e CDK6; elas não têm efeito sobre CDC2 e CDK2. Esses inibidores são p16^{INK4A}, p15^{INK4B}, p18^{INK4C} e p19^{INK4D}. Os três inibidores de CDK remanescentes descobertos, p21^{Cip1} (algumas vezes chamado p21^{Waf1}), p27^{Kip1} e p57^{Kip2} têm atividade mais ampla, sendo capazes de inibir todos os outros complexos ciclina-CDK que se formam em estágios finais do ciclo celular (Figura 8.13).

As ações dessas duas classes de inibidores de CDKs são ilustradas pela p15^{INK4B} e pelo duo p21^{Cip1} e p27^{Kip1}. Quando TGF-β é incubado com células epiteliais, uma série de respostas celulares que antagoniza a proliferação é gerada. Dentre essas, há um aumento substancial nos níveis de p15^{INK4B} que bloqueia a formação de complexos ciclina D-CDK4/6 (Figura 8.14), também inibindo aqueles já formados. Na ausência de complexos D-CDK4/6, a célula é incapaz de avançar através das etapas iniciais e médias de G₁ e atingir o ponto R. Uma vez que a célula tenha ultrapassado o ponto R, as ações dos complexos D-CDK4/6 parecem tornar-se desnecessárias. Isso pode explicar por que o TGF-β é um inibidor do crescimento durante o início e metade de G₁ e perde a maior parte – talvez totalmente – de seu potencial de inibição do crescimento uma vez que a célula ultrapassa o ponto R.

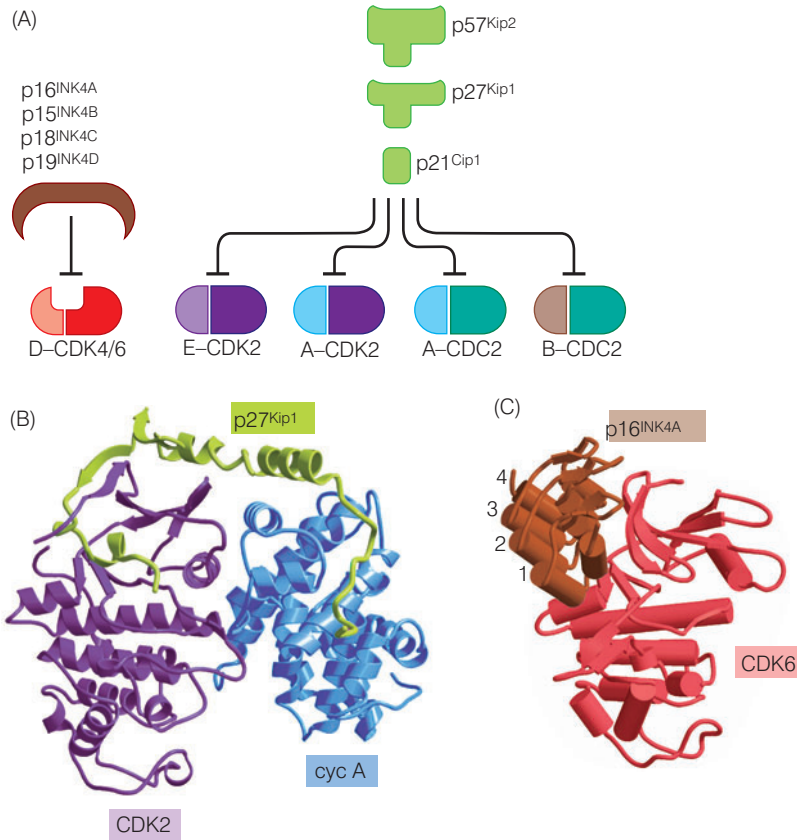


Figura 8.13 Ações dos inibidores de CDK (A) Os inibidores de CDK bloqueiam as ações das CDKs em vários pontos do ciclo celular. As quatro proteínas INK4 (p16^{INK4A}, p15^{INK4B}, p18^{INK4C} e p19^{INK4D}) são especializadas em inibir os complexos D-CDK4 e D-CDK6 que estão ativos no início e na metade de G₁. Contrariamente, as três Cip/Kip Cdkls (p21^{Cip1}, p27^{Kip1} e p57^{Kip2}) podem inibir os complexos ciclina-CDK remanescentes que estão ativos no curso do ciclo celular. (Relativamente pouco se sabe sobre as ações de p57^{Kip2}.) Paradoxalmente, p21^{Cip1} e p27^{Kip1} promovem a formação de complexos D-CDK4/6 durante a fase G₁ do ciclo celular (não-mostrado aqui, veja a Figura 8.17). (B) Essa apresentação do complexo entre p27^{Kip1} e a ciclina A-CDK2, derivada por cristalografia de raios X (veja também a Figura 8.7), ilustra como um domínio de p27^{Kip1} (verde claro) bloqueia a função da ciclina A-CDK2 pela obstrução do sítio de ligação do ATP na fenda catalítica da CDK. (C) Inibidores da classe INK4, como a p16^{INK4A} mostrada aqui (marrom avermelhado), ligam-se a CDK6 (vermelho) e a CDK4 (não-mostrado). Esses inibidores de CDK deformam o sítio de ligação da CDK6, reduzindo sua afinidade por ciclinas do tipo D. Ao mesmo tempo, elas deformam o sítio de ligação de ATP e, com isso, comprometem a atividade catalítica. Interações idênticas provavelmente caracterizam as respostas de CDK4 a p16^{INK4A}. (B, de A.A. Russo et al., *Nature* 382:325-331, 1996; C, de A.A. Russo et al. *Nature* 395:237-243, 1998.)

A p21^{Cip1}, uma inibidora de CDK de ação mais ampla, é também induzida pelo TGF- β , mas isso ocorre de modo mais tênue. Muito mais relevantes são os aumentos nos níveis da p21^{Cip1} que ocorrem em resposta a vários processos de estresse fisiológico (Figura 8.14A); uma vez

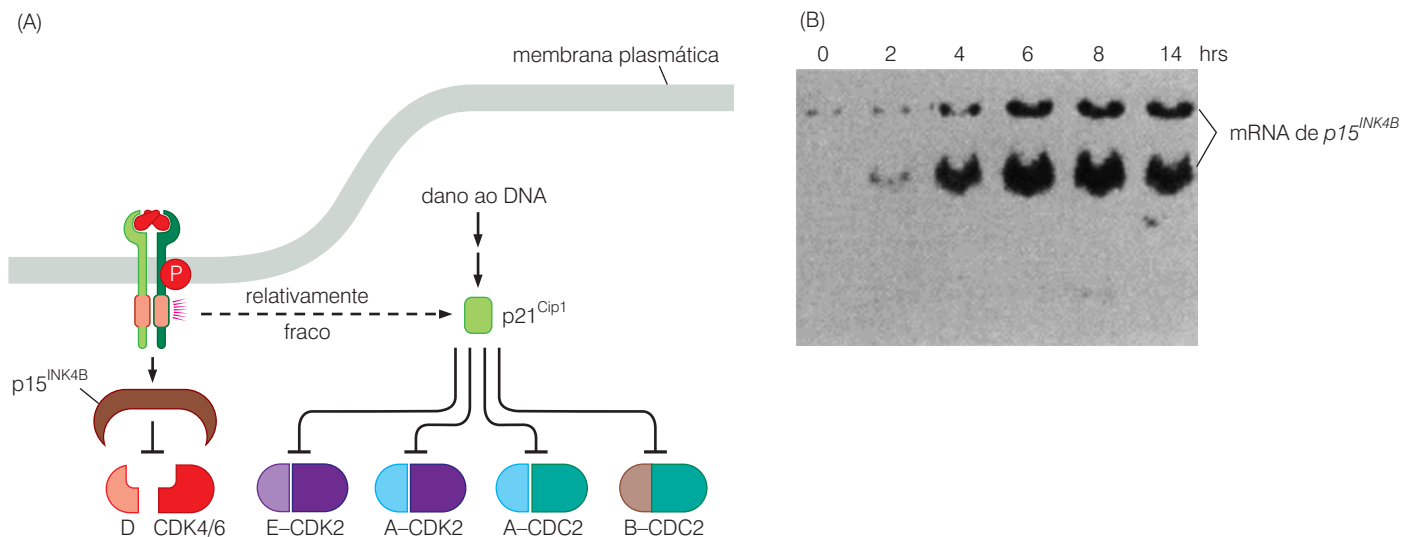


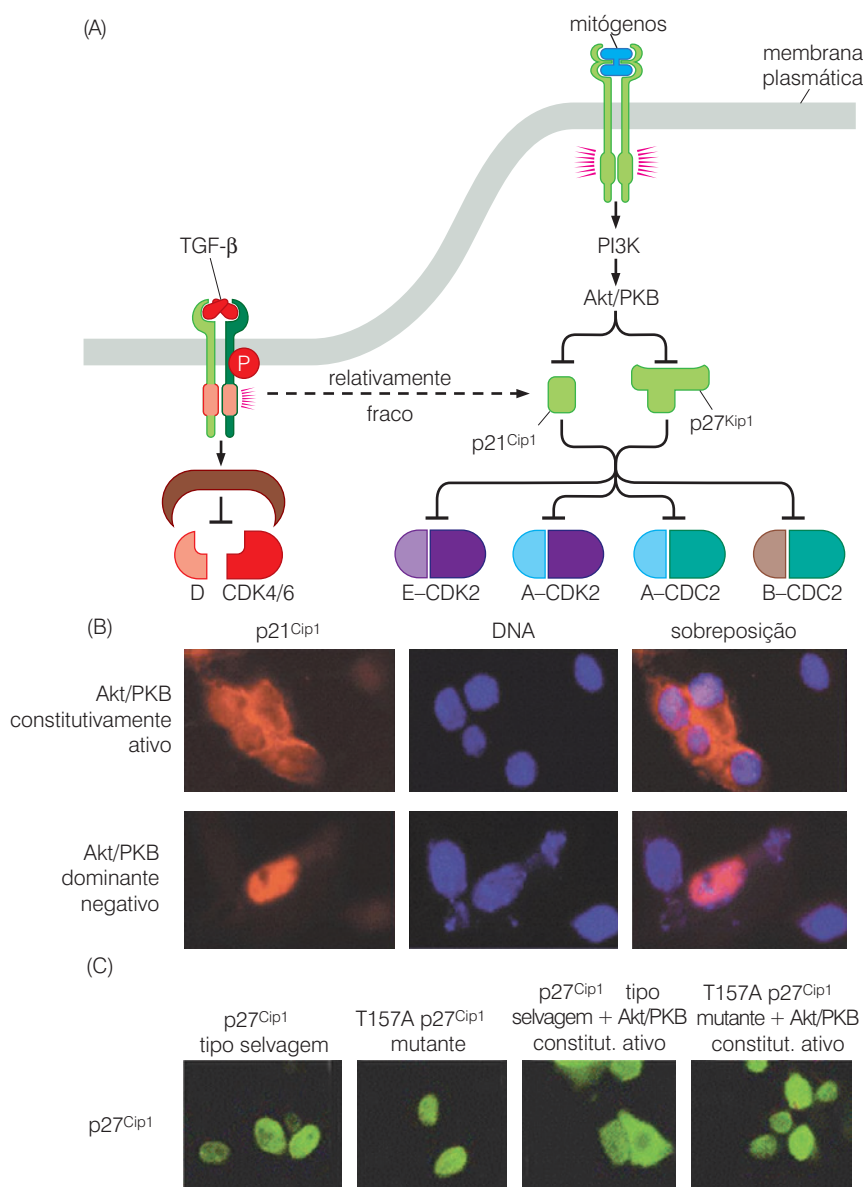
Figura 8.14 Controle da progressão do ciclo celular por TGF- β (A) O TGF- β (acima, à esquerda) controla a maquinaria do ciclo celular em parte por sua habilidade em modular os níveis dos inibidores de CDK. Ele age para induzir aumentada expressão da p15^{INK4B} e, fracamente, da p21^{Cip1}. A primeira pode bloquear as ações dos complexos ciclina D-CDK4/6, enquanto a última pode bloquear as ações dos complexos ciclina-CDK remanescentes que são ativos durante o restante do ciclo celular. Independentemente disso, o dano ao DNA celular causa fortes,

rápidos aumentos da p21^{Cip1}, que pode, por sua vez, desativar os complexos ciclina-CDK que estão ativos nas fases do ciclo celular após a passagem da célula através do ponto R na fase G₁ tardia. (B) Quando o TGF- β é aplicado a queratinócitos humanos, induzindo um dramático aumento de 30 vezes na síntese de mRNA da p15^{INK4B}, aqui demonstrado por meio de análise por *Northern blot*. Estas células foram expostas ao TGF- β pelos intervalos de tempo (em horas) indicados (acima). (B, G.J. Hannon e D. Beach, *Nature* 371:257-261, 1994.)

presente em níveis significativos, a p21^{Cip1} pode agir durante a maior parte do ciclo celular, parando a proliferação da célula. Nesse contexto, destaca-se o dano ao genoma celular. Contudo que o DNA genômico permaneça em um estado não-reparado, a p21^{Cip1} que foi induzida bloqueará a atividade dos complexos ciclina-CDK já formados, como E-CDK2, A-CDK2, A-CDC2 e B-CDC2, que já estavam ativos quando da indução do dano. Uma vez findo o reparo do DNA, o bloqueio imposto pela p21^{Cip1} é aliviado. Tal estratégia é particularmente importante em G₁: se o genoma celular é danificado durante esse período por agentes mutagênicos, a p21^{Cip1} bloqueará o avanço além do ponto R (por meio da inibição de complexos E-CDK2), até que o dano tenha sido reparado. Isso assegurará que a célula não avance pela fase S, com isso copiando seqüências de DNA ainda alteradas mutagenicamente. Além disso, a p21^{Cip1} pode inibir as funções de um componente essencial do complexo de replicação celular chamado PCNA (antígeno nuclear de células em proliferação). Assim, a síntese de DNA já iniciada é bloqueada até que o reparo do DNA tenha sido completado. Retornaremos aos mecanismos de controle de expressão da p21^{Cip1} no próximo capítulo (Seção 9.9).

Enquanto o dano ao DNA e o TGF- β aumentam os níveis de p21^{Cip1} (bloqueando o avanço pelo ciclo celular), mitógenos agem em direção oposta a fim de bloquear a ação deste inibidor de CDK,

Figura 8.15 Controle do avanço pelo ciclo celular por sinais externos Sinais extracelulares de contrabalanço influenciam a maquinaria do ciclo celular, em parte por meio da sua habilidade de controlar os níveis e localização intracelular dos inibidores de CDK. (A) Durante a fase G₁ do ciclo celular, o TGF- β induz a expressão de p15^{INK4A} e (fracamente) p21^{Cip1}, afetando de forma negativa os complexos D-CDK4/6 e E-CDK2, respectivamente (veja a Figura 8.14). Contrariamente, mitógenos agindo por meio de Akt/PKB causam a fosforilação e a localização citoplasmática de ambos, p21^{Cip1} e p27^{Kip1}, que impedem tais inibidores de CDK de entrar no núcleo e bloquear as atividades de complexos ciclina-CDK operando nele. (B) Expressão ectópica de Akt/PKB constitutivamente ativo (linha superior) faz com que a p21^{Cip1} (vermelho, à esquerda) localize-se predominantemente no citoplasma. Compare essa localização com aquela do núcleo celular (azul, centro); a sobreposição dessas duas imagens é também vista (à direita). Contrariamente, a expressão de um dominante negativo Akt/PKB (linha inferior), que interfere na função de AKT/PKB, permite à p21^{Cip1} localizar-se no núcleo, onde ela pode inibir a progressão do ciclo celular. (C) Em células normais (primeiro painel), p27^{Kip1} tipo selvagem ectopicamente expressa (verde) é exclusivamente localizada no núcleo. Esta localização não é alterada se uma p27^{Kip1} mutante que não contém uma treonina normalmente fosforilada por Akt/PKB é expressa (segundo painel). (O mutante T157A tem uma alanina em lugar desta treonina.) Se um mutante Akt/PKB constitutivamente ativo é expresso, entretanto, muito da p27^{Kip1} tipo selvagem é agora vista no citoplasma (terceiro painel). Mas se a p27^{Kip1} mutante que não pode ser fosforilada por Akt/PKB é expressa, ela resiste às ações da Akt/PKB constitutivamente ativada e permanece no núcleo (quarto painel). (B, de B. Zhou et al., *Nat. Cell Biol.* 3:245-252, 2001; C, de G. Vigiletto et al. *Nat. Med.* 8:1136-1144, 2002.)



com isso favorecendo o avanço pelo ciclo celular. Um mecanismo pelo qual isso ocorre depende da rota da fofatidilinositol 3 cinase (PI3K), que é ativada direta ou indiretamente por mitógenos que estimulam muitos receptores do tipo tirosina cinase (Figura 8.15A). Akt/PKB, a importante cinase ativada *downstream* da PI3K ativada por mitógeno (Seção 6.6), promove a fosforilação das moléculas de p21^{Cip1} nucleares, fazendo com que elas sejam exportadas para o citoplasma. Nesse compartimento, elas não mais podem ligar-se e inibir complexos ciclina-CDK (Figura 8.15B). Da mesma forma, a Akt/PKB fosforila a p27^{Kip1} (que age similarmente a p21^{Cip1}), impedindo-a de ser exportada do citoplasma para o núcleo, compartimento onde ela exerce sua função (Figura 8.15C). Tomadas em conjunto, essas respostas ilustram como sinais extracelulares inibidores de crescimento (exemplificados pelo TGF- β) impedem o avanço do relógio do ciclo celular, enquanto sinais promotores de crescimento estimulam a célula a progredir em direção oposta.

Esses efeitos na localização intracelular parecem ter consequências clínicas. Por exemplo, em carcinomas de mama humanos de baixo grau (i. e., pouco avançados), os níveis de Akt/PKB são baixos, e a p27^{Kip1} é então capaz de exercer seu efeito antiproliferativo no núcleo. Em tumores avançados, entretanto, a presença de Akt/PKB ativada é abundante, e a maior parte da p27^{Kip1} é encontrada no citoplasma (Figura 8.16A). Esta localização intracelular correlaciona-se com a progressão desses tipos de câncer para prognósticos fatais (Figura 8.16B).

Um aspecto do comportamento de p21^{Cip1} e p27^{Kip1} gera, entretanto, um paradoxo: elas inibem a ação das ciclinas E-CDK2, A-CDC2 e B-CDC2, mas *estimulam* a formação dos complexos de ciclina D-CDK4/6 (Figura 8.17A). Além disso, uma vez que complexos ternários (de três partes) tenham sido formados entre D-CDK4/6 e qualquer um desses inibidores

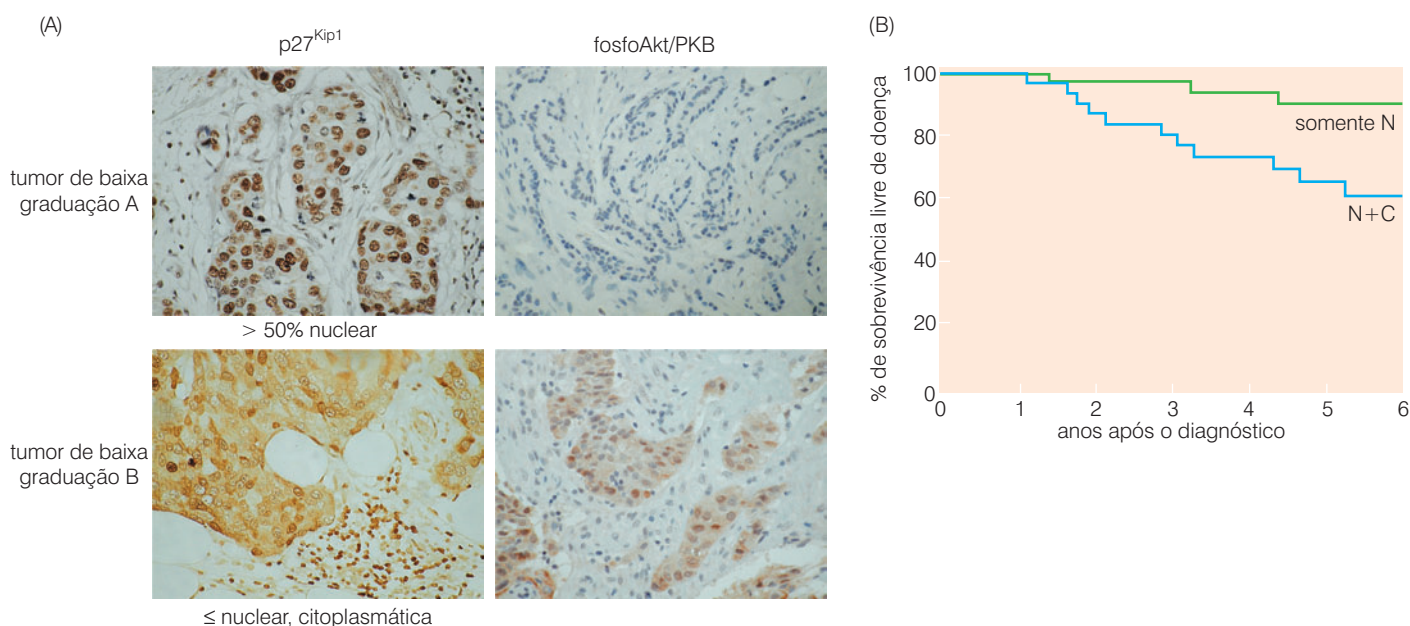
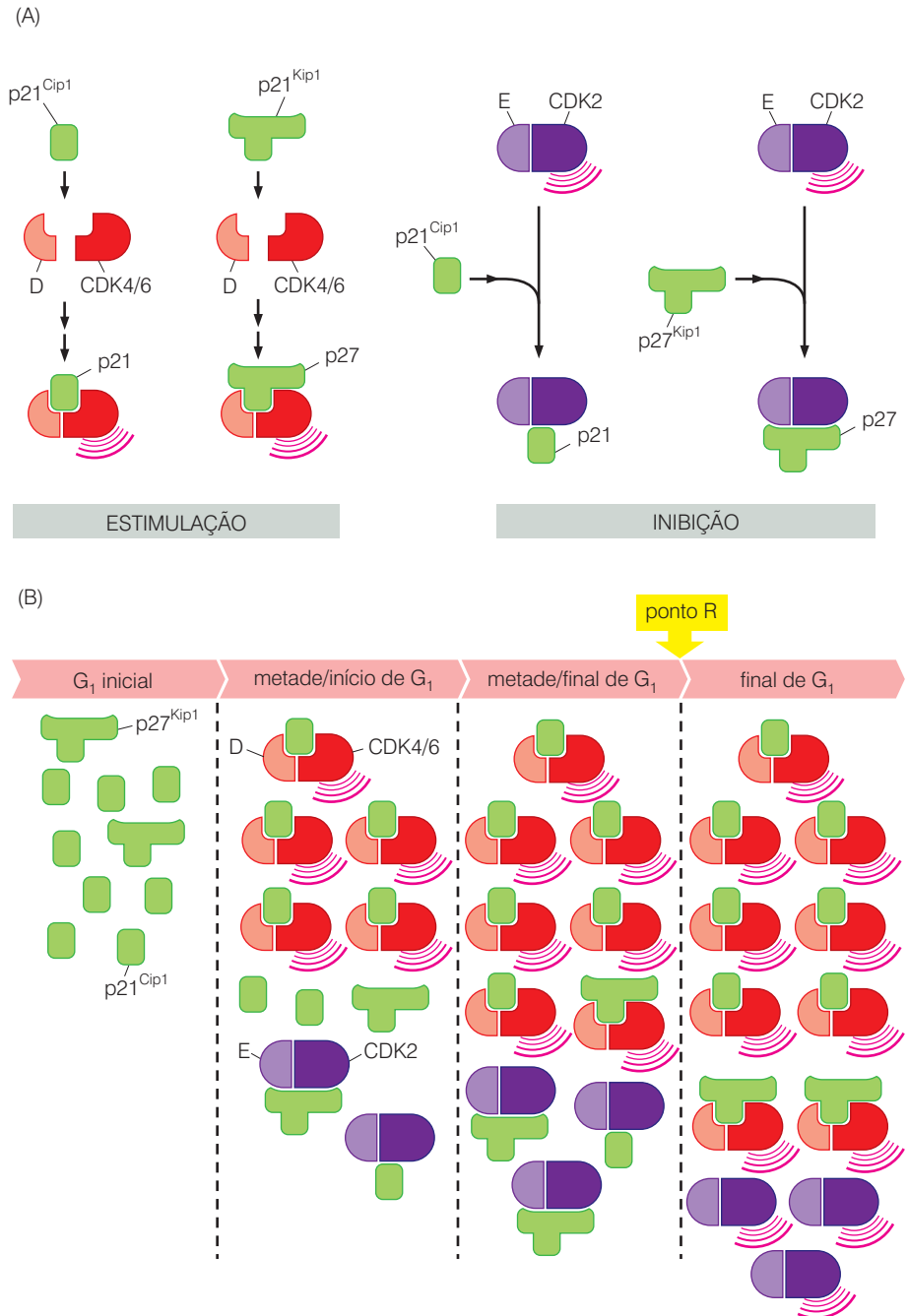


Figura 8.16 A supressão da função da p27^{Kip1} por Akt/PKB em cânceres de mama humanos. Vários cânceres de mama mostram diferentes localizações intracelulares de p27^{Kip1} que refletem o estado de ativação de Akt/PKB; este último pode ser identificado por meio de um anticorpo que reconhece especificamente a forma fosforilada, funcionalmente ativa, da enzima p27^{Kip1}. (A) Em alguns cânceres de mama primários de baixo grau (p. ex., tumor A), a p27^{Kip1} encontra-se exclusivamente no núcleo e está claramente presente em mais de 50% do núcleo (coloração marrom, à esquerda, acima, > 50% nuclear); a fosfo-Akt/PKB ativada não pode, entretanto, ser detectada nessas células (à direita, acima). Contrariamente, em outros tumores (p. ex., tumor B, painel à esquerda, abaixo), a p27^{Kip1} é encontrada (coloração em marrom amarelado) em menos de 50% do núcleo, bem como em quantidades significativas no citoplasma (≤ 50% nuclear, citoplasmática),

onde não pode bloquear a proliferação celular; nesses tumores, a fosfo-Akt/PKB ativada pode ser prontamente detectada (coloração marrom-claro, painel à esquerda, abaixo). (B) Este gráfico de Kaplan-Meier indica que pacientes portadores de tumores primários com p27^{Kip1} concentrada predominantemente no núcleo (curva verde) têm um prognóstico de sobrevivência a longo prazo relativamente bom, com ausência da doença por um período de seis anos seguindo-se ao diagnóstico e tratamento. Contrariamente, pacientes cujos tumores apresentam a p27^{Kip1} corada em ambos, núcleo e citoplasma (curva azul), sofrem de reincidências durante esse período, muitas das quais levando à morte. (Essa correlação com o achado clínico não estabelece relação causal, isto é, a alteração na localização da p27^{Kip1} causa progressão clínica do tumor.) (A, cortesia de J. Zubovitz e J. M. Slingerland; B, de J. Liang et al., *Nat Med* 8:1153-1160, 2002.)

Figura 8.17 Interações de inibidores de CDK com complexos ciclina-CDK (A) Os vários inibidores de CDK afetam complexos ciclina-CDK de formas distintas. Os inibidores de CDK das famílias $p21^{Cip1}$ e $p27^{Kip1}$, enquanto inibem os complexos ciclina-CDK ativos nas fases tardias de G_1 , S , G_2 e M (apenas E-CDK2 está mostrada aqui; à direita), na verdade estimulam a formação dos complexos D-CDK4/6 que são ativos no início e na metade da fase G_1 e permitem a esses complexos, uma vez formados, tornarem-se cataliticamente ativos (à esquerda). (B) Células no início da fase G_1 frequentemente apresentam concentrações substanciais de dois inibidores de CDK, moléculas de $p21^{Cip1}$ e $p27^{Kip1}$ (verde; à esquerda). À medida que os complexos ciclina D-CDK4/6 (vermelho/rosa) acumulam-se das fases iniciais à metade de G_1 (sendo estimulado por mitógenos extracelulares), eles se ligam e sequestram uma porção imutável de moléculas de $p21^{Cip1}$ e $p27^{Kip1}$, incluindo aí aqueles que estão presentes solúveis (não-ligados a qualquer complexo ciclina-CDK), bem como aqueles associados a complexos ciclina E-CDK2 (púrpura claro e escuro). A ligação por meio de complexos D-CDK4/6 destes dois inibidores de CDK não afeta negativamente a atividade catalítica dos complexos D-CDK4/6 (veja o painel A). Entretanto, à medida que esse processo prossegue, os complexos D-CDK4/6 finalmente conseguem sequestrar dos complexos E-CDK2 a maior parte das moléculas de $p21^{Cip1}$ e $p27^{Kip1}$ na fase tardia de G_1 (à direita). Isso finalmente libera os complexos E-CDK2 (abaixo, à direita), permitindo a eles desencadear a transição pelo ponto R e iniciar os eventos de fosforilação que conduzem as células para a fase tardia de G_1 e, daí, para a fase S.



de CDK, o complexo ciclina-CDK ainda tem a capacidade de fosforilar seu substrato. Assim, o termo “inibidores de CDK” é, de fato, não-apropriado. As duas proteínas ($p21^{Cip1}$ e $p27^{Kip1}$) agem na maioria dos complexos ciclina-CDK como inibidores e sobre os complexos de ciclina D-CDK4/6 como estimuladoras.

Apesar de a $p27^{Kip1}$ funcionar de modo semelhante a $p21^{Cip1}$ de várias maneiras, ela tem um interessante comportamento: quando as células estão no estado de quiescência G_0 , a $p27^{Kip1}$ está presente em altas concentrações e, portanto, liga-se e suprime a atividade de poucos complexos ciclina E-CDK2 que encontram-se presentes na célula. Após a exposição a fatores de crescimento, os complexos ciclina D-CDK4/6 acumulam-se na célula, pois esses agentes mitógenos promovem aumento nos níveis de ciclinas do tipo D. Cada vez que um novo complexo ciclina D-CDK4/6 se forma, ele captura e liga-se a outra molécula de $p27^{Kip1}$; conseqüentemente, o estoque de moléculas de $p27^{Kip1}$ livres na célula sofre redução devido à

ligação com os complexos D-CDK4/6. Após muitas horas, as moléculas de p27^{Kip1} remanescentes são removidas dos complexos ciclina E-CDK2 (Figura 8.17B). Uma vez que uma pequena porção dos complexos ciclina E-CDK2 são liberados do jugo da p27^{Kip1}, eles estarão livres para desencadear a passagem da célula através do ponto R.

Evidências indicam que o estado pós-mitótico de muitos tipos de células diferenciadas é regulado por vários inibidores de CDK agindo isoladamente ou em conjunto. Por exemplo, como visto aqui, no cerebelo em desenvolvimento de um camundongo, as camadas de células que se tornaram pós-mitóticas têm altos níveis de p27^{Kip1}, enquanto aquelas que ainda permanecem no ciclo ativo carecem deste inibidor (Figura 8.18A). Além disso, sendo esse tecido formado precocemente após o nascimento, as células dessa parte do cérebro são mantidas em um estado pós-mitótico pela p27^{Kip1} que é expressa em níveis elevados e constantes durante a idade adulta (Figura 8.18B).

Somando-se aos inibidores de CDK, outro nível de controle de complexos ciclina-CDK é imposto por modificações covalentes das moléculas de CDK propriamente ditas (Barra lateral 8.3). Enquanto a falta de regulação das ações dos inibidores de CDK contribui muito para o desenvolvimento do câncer, como descrito a seguir, existem poucas evidências indicando que esse controle adicional tem um papel crítico em etapas específicas da progressão tumoral.

8.5 Oncoproteínas virais revelam como a pRb bloqueia o avanço pelo ciclo celular

Revisamos as etapas do ciclo celular a partir de diferentes ângulos, aí incluindo suas bem-definidas fases G₁, S, G₂ e M, as ciclinas e CDKs que orquestram o avanço através dessas

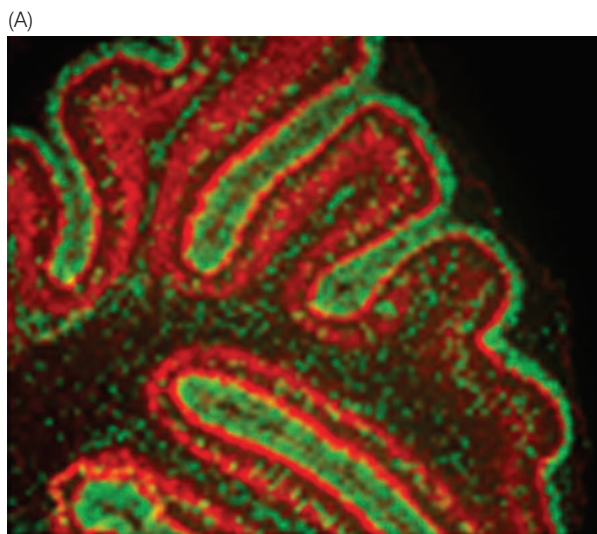
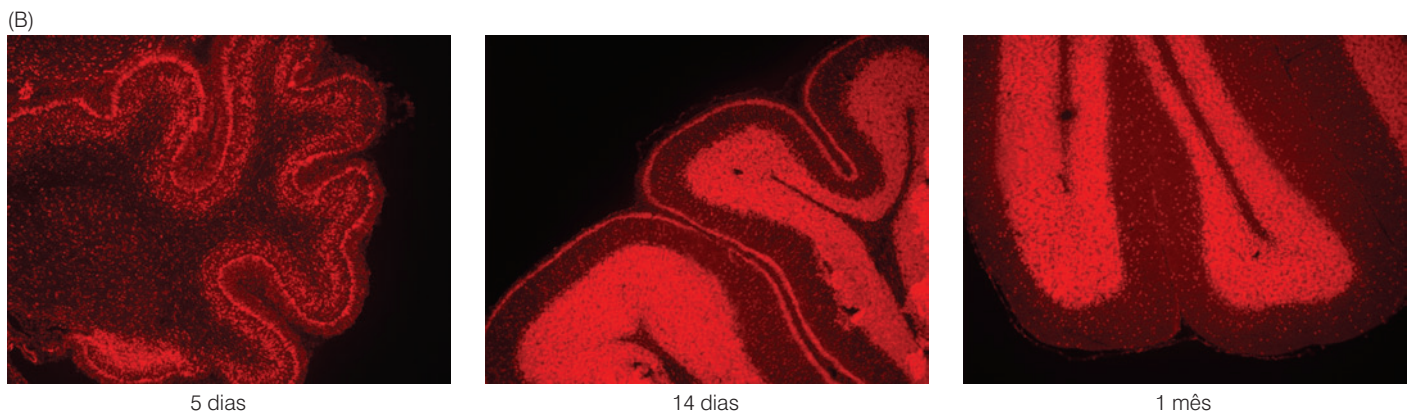


Figura 8.18 Indução de um estado pós-mitótico em células cerebelares pela p27^{Kip1}. Muito do desenvolvimento cerebelar pós-natal dos mamíferos ocorre durante a diferenciação e entrada das células em um estado pós-mitótico. (A) Durante o curso deste desenvolvimento no cerebelo de camundongo, células em proliferação podem ser detectadas por meio de sua incorporação de bromodeoxiuridina (BrdU), um análogo da timidina; elas são reveladas aqui sete dias após o nascimento por meio de imunofluorescência usando um anticorpo que reconhece DNA contendo BrdU (*verde*). Os níveis da p27^{Kip1} foram detectados mediante um anticorpo marcado fluorescentemente que a reconhece na mesma secção (*vermelho*). Como pode ser visto, a p27^{Kip1} sofre acúmulo nas células que cessaram sua proliferação. (B) À medida que a maturação do cerebelo progride após o nascimento, os níveis da p27^{Kip1} (*vermelho*) aumentam progressivamente nas células granulosas do cerebelo que não se apresentam em processo de divisão e permanecem aumentados no decorrer da fase adulta a fim de manter essas células em um estado pós-mitótico. (A, de T. Uziel, F. Zindy, S. Xie et al., *Genes Dev.* 19:2656-2667, 2005; B, cortesia de A. Forget, F. Zindy e M.F. Roussel.)



Barra lateral 8.3 A fosforilação das moléculas de CDK também controla sua atividade

Um outro nível de controle inserido na maquinaria do relógio do ciclo celular pode ser identificado como alterações covalentes das moléculas de CDK propriamente ditas. Mais especificamente, as CDKs devem ser fosforiladas em resíduos de aminoácidos específicos a fim de serem ativadas (veja a Figura 8.7). Ao mesmo tempo, fosforilações de caráter inibitório em outros resíduos de aminoácidos podem ser removidas. As fosforilações estimuladoras são mediadas por uma serina/treonina cinase chamada CAK (cinase ativadora de CDK), enquanto as fosforilações inibitórias são removidas por uma classe de fosfatases chamadas CDC25A, B e C, as quais não serão abordadas aqui devido às escassas evidências de que estão desreguladas em células cancerosas.

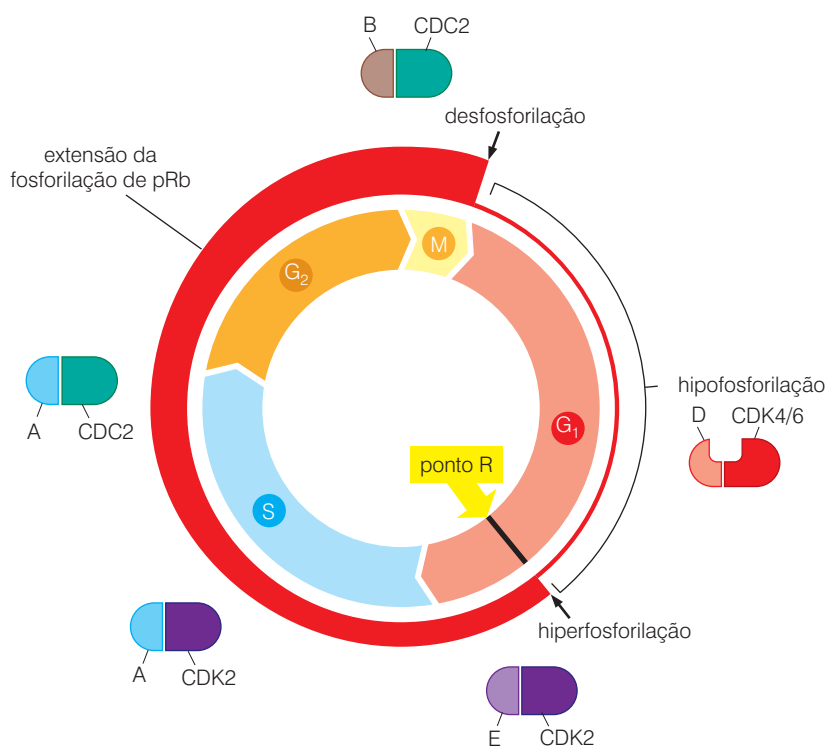
fases e o fato de que tal avanço no ciclo celular pode ser rastreado desde o início quando sinais extracelulares induzem a célula a entrar no ciclo celular ativo e ultrapassar o ponto de restrição (R). Essas descrições, entretanto, falham em revelar precisamente como a transição além do ponto R ocorre em nível molecular.

A solução desse “quebra-cabeça” foi proporcionada pelo isolamento do gene supressor de tumores *Rb*. Defeitos na expressão de *Rb* estão associados à patogênese de retinoblastomas, sarcomas e carcinomas pulmonares de células pequenas, bem como de outros tipos de tumor (Seções 7.3 a 7.5). Logo após o isolamento do gene *Rb*, em 1986, tornou-se aparente que este codifica uma fosfoproteína nuclear de cerca de 105 kD de massa. Tal proteína, chamada de pRb ou RB, está ausente ou presente sob uma forma defeituosa nas células de muitos dos tipos de tumores citados anteriormente.

Experimentos iniciais com pRb revelaram que ela sofre fosforilação concomitantemente com o avanço das células pelo ciclo celular. Mais especificamente, pRb é essencialmente não-fosforilada quando as células estão em G₀. Elas tornam-se pouco fosforiladas (**hipofosforiladas**) em um reduzido número de resíduos de serina e treonina após a entrada em G₁. De maneira importante, pRb torna-se extensivamente fosforilada (**hiperfosforilada**) em um número muito maior de resíduos de serina e treonina quando a célula avança além do ponto R (Figura 8.19). Uma vez que as células tenham passado o ponto R, pRb em geral permanece hiperfosforilada durante o restante do ciclo celular. Após a mitose, os grupos fosfato da forma fosforilada de pRb são removidos pela proteína fosfatase tipo 1 (PP1). Esse processo final cria condições para uma nova rodada do ciclo celular e, como consequência, para um novo ciclo de fosforilação de pRb.

O fato de que a hiperfosforilação de pRb ocorre em conjunto com a passagem pelo ponto R forneceu a primeira pista indicando ser esta proteína a governadora do processo molecular que leva à transição pelo ponto R. Outra evidência crítica desse processo veio com a descoberta, em 1988, de interações físicas entre oncoproteínas codificadas no DNA de vírus tumorais e pRb. Lembre-se que vírus tumorais de DNA são capazes de transformar células e o fazem por meio de oncoproteínas codificadas em DNA. Diferentemente de oncoproteínas

Figura 8.19 Fosforilação da pRb dependente do ciclo celular. O estado de fosforilação de pRb (*círculo vermelho*) é estritamente coordenado com o avanço pelo ciclo celular. À medida que as células passam através da transição M/G₁, virtualmente todos os grupos fosfato são retirados da pRb, deixando-a em um estado *não-fosforilado*. À medida que as células progridem através de G₁, números relativamente pequenos de grupos fosfato são adicionados (por complexos ciclina D-CDK4/6), gerando pRb *hipofosforilada*. Entretanto, quando as células passam pelo ponto de restrição (R), complexos ciclina E-CDK2 fosforilam pRb fortemente, tornando-a *hiperfosforilada*. Durante o resto do ciclo celular, a fosforilação da pRb continua a aumentar até que as células entrem na fase M.



derivadas de vírus tumorais de RNA como RSV, vírus tumorais de DNA valem-se de oncoproteínas que têm pouca semelhança com as proteínas que existem naturalmente dentro de células não-infectadas (Seções 3.4 e 3.6).

Um trabalho publicado em 1988 revelou outro importante mecanismo pelo qual uma oncoproteína codificada em um vírus de DNA pode romper o circuito de regulação de crescimento celular; a caracterização bioquímica da oncoproteína produzida pelo oncogene E1A do adenovírus humano tipo 5 revelou que em células transformadas com adenovírus essa oncoproteína encontra-se ligada a várias proteínas celulares, dentre elas pRb (Figura 8.20; Barra lateral 8.4). Logo mais, a oncoproteína T codificada no vírus SV40 e a oncoproteína E7 de certas cepas de papilomavírus humanos (HPV) que causam carcinoma cervical humano foram também associadas à formação de complexos físicos com a pRb em células transformadas com vírus.

Essas três oncoproteínas associadas ao DNA viral (EA1, antígeno “large T” e E7) não se relacionam estruturalmente entre si, apesar de todas afetarem a mesma proteína, isto é, a pRb. Isso sugere que um processo de convergência evolucionária levou, em pelo menos três situações, ao desenvolvimento de oncoproteínas virais capazes de perturbar a pRb celular. Em outras palavras, uma vez que a evolução e a seleção natural permitem a perpetuação de vírus que podem multiplicar-se mais eficientemente, tais descobertas sugeriram que o seqüestro ou inativação da pRb pelas três oncoproteínas citadas anteriormente é necessária para uma ótima replicação viral em células infectadas.

A descoberta da formação de complexos entre proteínas virais e proteínas das células hospedeiras teve um profundo impacto em nossa compreensão de como os vírus transformam as células por eles infectadas. As especulações inspiradas por essas descobertas geraram algumas teorias: sabia-se que em uma célula normal o gene *Rb* agia como um supressor de tumores. Assim, o gene *Rb*, por meio de seu produto, a proteína Rb, deve inibir a proliferação celular de alguma forma. Vírus de DNA com potencial de gerar tumores podem sabotar a ação da pRb mediante sua inativação por formação de complexos. Nesse processo, a pRb é removida do circuito regulador da célula gerando o mesmo efeito decorrente da perda das duas cópias do gene *Rb* cromossômico por meio de mutações. Isso sugeriu também que os vírus de DNA capazes de induzir tumores o faziam por sua habilidade em desativar essa importante proteína inibidora do crescimento celular. Isso liberaria a célula infectada por vírus da supressão exercida por pRb. (De fato, a proteína E7 do HPV vai além do simples seqüestro de pRb, uma vez que ela também marca pRb para ubiquitinação e, assim, degradação proteolítica; veja a Barra lateral 7.8).

Uma outra pista da função de pRb veio da descoberta de que oncoproteínas de vírus de DNA de potencial tumoral ligam-se preferencialmente às formas hiperfosforiladas de pRb, isto é, as formas de pRb que estão presentes na maior parte de G_1 (Figura 8.19). As formas de pRb que encontram-se hiperfosforiladas na fase tardia de G_1 e em fases subseqüentes do ciclo celular são ignoradas pelas proteínas virais. Isso levou a outra especulação: oncoproteínas tumorais virais dirigem sua atividade inativadora somente sobre formas de pRb que são dignas de sua atenção, isto é, as formas relacionadas à inibição do crescimento encontradas desde o início até a metade de G_1 . As oncoproteínas virais ignoram aquelas formas de pRb que já encontram-se inativadas por outros mecanismos.

Tal premissa indicou que formas da pRb hipofosforiladas e presentes no início e no meio da fase G_1 são ativamente inibidoras do crescimento, enquanto as formas hiperfosforiladas encontradas após o ponto R perderam seu potencial de inibição do crescimento, tendo sido funcionalmente inativadas por essa fosforilação. Isso significou que a transição pelo ponto R, que é definida como um critério fisiológico (aquisição de independência de fatores de crescimento), é acompanhada por uma modificação bioquímica de pRb que a converte de uma proteína de inibição do crescimento em outra que parece ser inerte funcionalmente. Essas especulações foram mais tarde confirmadas experimentalmente. Além disso, pesquisas revelaram que o controle da fosforilação de pRb é mais dinâmico do que aquele descrito na Figura 8.19.

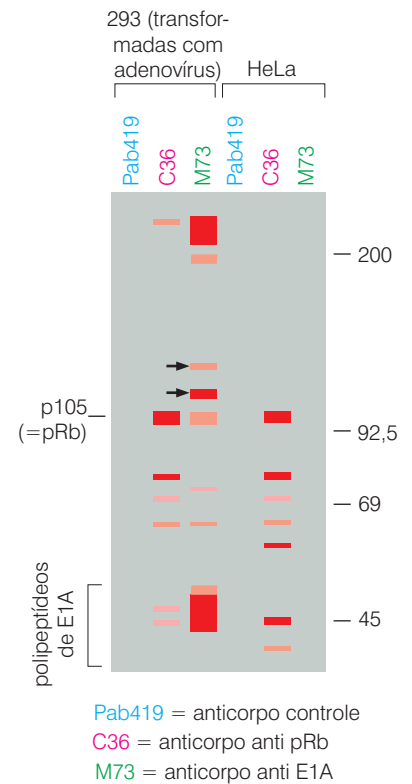


Figura 8.20 Co-precipitação de proteínas celulares com adenovírus E1A A imunoprecipitação da oncoproteína do adenovírus E1A a partir de células 293 transformadas com adenovírus usando o anticorpo monoclonal M73 anti-E1A revelaram um substancial grupo de proteínas celulares que co-precipitaram com E1A, incluindo pRb (chamada aqui de p105) (terceira canaleta); subseqüentemente outras proteínas da célula hospedeira que co-precipitaram foram identificadas, incluindo as duas proteínas primas de pRb, p107 e p130 (terceira canaleta, setas). O anticorpo monoclonal M73 anti-E1A falhou em imunoprecipitar tanto E1A como as proteínas das células hospedeiras de células HeLa, que não estão transformadas pelo adenovírus (três canaletas à direita). Um anticorpo controle (Pab419) falhou em imunoprecipitar qualquer uma dessas proteínas de qualquer tipo de célula; um anticorpo anti pRb (C36) imunoprecipitou p105 (= pRb) de ambas as linhagens de células, 293 e HeLa. Bandas escuras e claras no autoradiograma são representadas aqui por diferentes matizes de vermelho. (Adaptada de P. Whyte et al., *Nature* 334:124-129, 1988.)

Barra lateral 8.4 As oncoproteínas virais E1A e “large T” buscam muitos alvos celulares Como mostrado na Figura 8.20, um anticorpo monoclonal pode imunoprecipitar não apenas E1A, mas também um grande número de proteínas celulares que estão fisicamente associadas a E1A em células transformadas com adenovírus. A primeira destas a ser identificada foi a pRb, mas logo duas outras proteínas relacionadas à pRb, chamadas p107 e p130, foram identificadas; a pRb e suas duas “primas” são frequentemente designadas “**proteínas tipo pocket**” (Figura 8.21A), pelas razões discutidas a seguir. Mais tarde, uma proteína celular de maior peso molecular, chamada p300, foi também identificada como sendo um alvo de ligação da E1A. Vários outros alvos celulares de ligação de E1A ainda precisam ser identificados.

Dessas três proteínas tipo *pocket*, a p130 parece ser especificamente importante na imposição de quiescência em certos tipos de células e está assim envolvida no controle da emergência das células da fase G_0

para G_1 do ciclo celular (Figura 8.21B). A expressão da p107, entretanto, é bastante induzida à medida que as células passam pelo ponto R. Essas duas primas de pRb (p107 e p130) têm funções secundárias no desenvolvimento do câncer, pois versões mutantes delas raramente são encontradas em tumores humanos, de forma contrária às frequentemente observadas mutações em cópias do gene *Rb*. Um trabalho posterior mostraria que a ligação de várias proteínas do hospedeiro por E1A leva à sua alteração funcional, incluindo sua inativação. Assim, essa ligação de E1A múltiplas proteínas celulares indica que o adenovírus, pela introdução de uma única proteína viral, pode agir para romper ou desregular circuitos de controle celular múltiplos concomitantemente. Oncoproteínas virais, como a E1A do adenovírus ou o papilomavírus humano E7, são capazes de ligar-se a todas as três proteínas tipo *pocket* pela associação com um sulco raso que está presente em todas as três proteínas e é muito conservado evolucionariamente (Figura 8.21C).

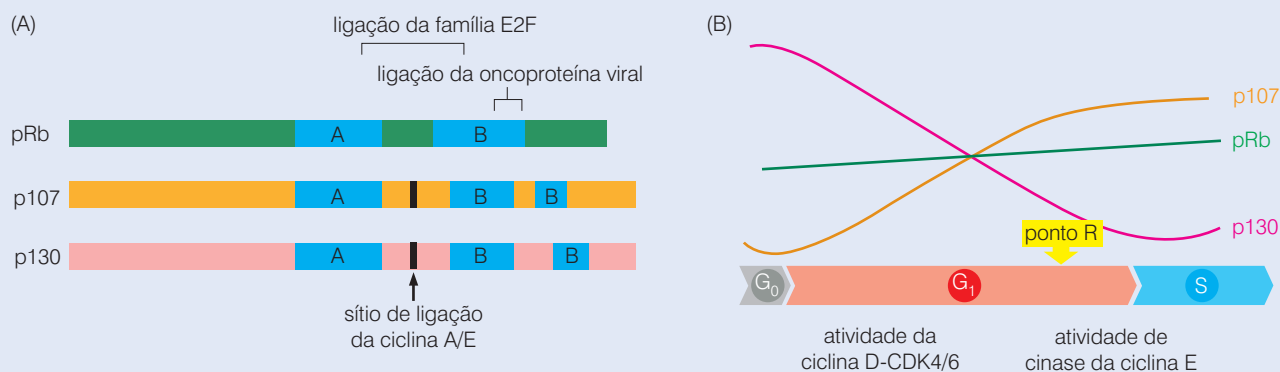


Figura 8.21 Proteínas tipo *pocket* (A) A pRb é uma de três proteínas relacionadas estruturalmente que, em conjunto, são chamadas “proteínas tipo *pocket*”. Todas as três ligam-se a oncoproteínas virais, como a E1A do adenovírus (Figura 8.20), a proteína “large T” de SV40 e a E7 do papilomavírus. Todas essas proteínas são fosforiladas por complexos ciclina D-CDK4/6, e diferentes proteínas tipo *pocket* ligam-se a diferentes subgrupos de fatores de transcrição E2F, como discutido mais tarde. (B) As diferentes proteínas do tipo *pocket* são expressas em tempos distintos à medida que as células emergem da quiescência. A p130 está envolvida na imposição da quiescência característica de G_0 , a pRb está ativamente envolvida no controle do avanço através da maior parte de G_1 , e p107 está envolvida no controle do avanço através da fase tardia de G_1 e S . (C) O sulco raso no qual oncoproteínas virais ligam-se (usando uma sequência de aminoácidos LxCxE encontrada por todas essas oncoproteínas, em que “x” é variável) é estruturalmente muito conservado dentre as proteínas pRb de cinco espécies de mamíferos, bem como a p107 e a p130 humanas, o que explica a habilidade das oncoproteínas virais de ligar-se a todas essas três proteínas celulares. Esse sulco é apresentado aqui como um modelo de espaço preenchido. O grau de conservação da sequência é indicado por diferentes tons de verde, com os resíduos mais conservados sendo apresentados em verde escuro. A estrutura polipeptídica do domínio de ligação da pRb do papilomavírus humano E7 é mostrada aqui em amarelo. (B, de M. Classon e N. Dyson, *Exp. Cell. Res.* 264:135-147, 2001; C, de J.O. Lee et al. *Nature* 392:859-865, 1998.)

Assim, se a célula é submetida a estresse fisiológico nas fases S ou G_2 , a fosforilação de pRb pode ser revertida por fosfatases ainda desconhecidas e, com isso, retornar ao seu estado de inibição de crescimento ativo. Como geradores de estresse fisiológico temos a hipoxia, o dano ao DNA e o rompimento do fuso mitótico. A reativação da inibição do crescimento mediada por pRb é presumivelmente somente transitória e será revertida após a parada da fonte de estresse e/ou resolução do dano.

8.6 A pRb é disponibilizada pelo relógio do ciclo celular para servir como uma guardiã do portão do ponto de restrição

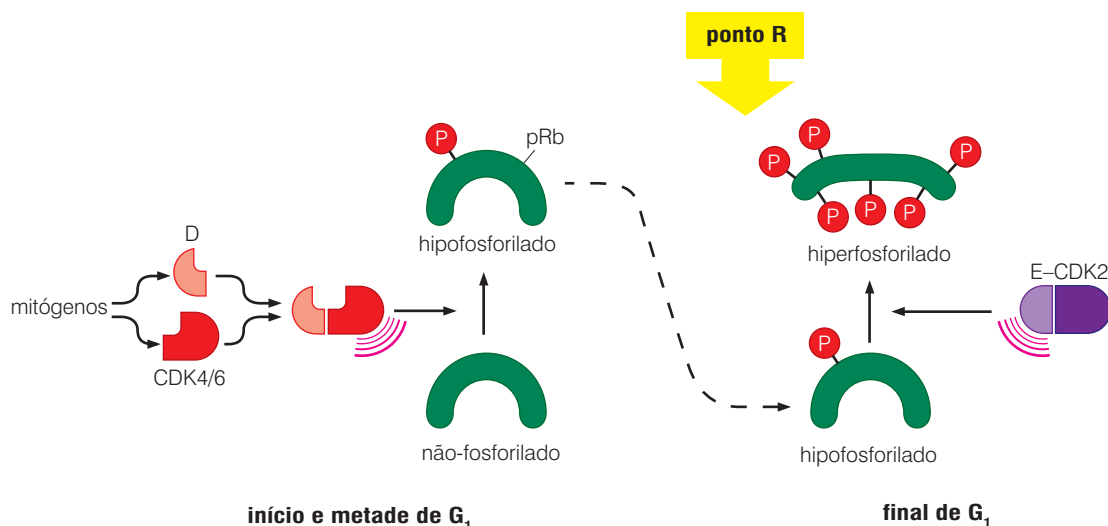
Várias linhas de evidência convergem para o fato de que a pRb, a proteína inibidora do crescimento desde o início até a metade da fase G_1 , torna-se inativada por extensiva fosforilação quando a célula ultrapassa o ponto R e, daí em diante, é completamente inativada como supressor do crescimento celular. Com efeito, a pRb serve como uma guardiã desse portão, mantendo-o fechado até que ele se torne hiperfosforilado. Tendo isso ocorrido, a pRb perde sua propriedade de inibição do crescimento, abre o portão e permite que a célula entre na fase tardia de G_1 e, daí em diante, nas demais etapas do ciclo celular.

Uma vez que a pRb é o árbitro que julgará entre crescimento e não-crescimento, sua fosforilação deve ser cuidadosamente controlada. Não por acaso, sua fosforilação é controlada por componentes do relógio do ciclo celular. Na fase inicial e metade de G_1 , ciclinas do tipo D juntamente de suas parceiras cinases CDK4/6 são responsáveis pelo início da fosforilação de pRb, levando à sua hiperfosforilação. Como os níveis de ciclinas do tipo D parecem ser em grande parte controlados por sinais extracelulares, como fatores de crescimento mitogênicos, podemos agora esboçar uma linha direta de sinalização: fatores de crescimento induzem a expressão de ciclinas tipo D que, em colaboração com suas respectivas CDK4/6, iniciam a fosforilação de pRb (Figura 8.22).

No curso de um ciclo celular normal, essa hipofosforilação de pRb parece ser necessária, mas não suficiente, para a subsequente inativação funcional da pRb no ponto R que requer a sua hiperfosforilação. De fato, os níveis da ciclina E aumentam dramaticamente no ponto R. A ciclina E então associa-se com sua parceira CDK2, e esse complexo leva à fosforilação de pRb até o fim, deixando pRb no seu estado hiperfosforilado funcionalmente inativo (veja a Figura 8.22). Parece que as moléculas de pRb que não sofreram hipofosforilação prévia por complexos ciclina D-CDK4/6 não constituem bons substratos para a conclusão da fosforilação pelos complexos ciclina E-CDK2. A fosforilação e inativação funcional das primas de pRb, p107 e p130, estão igualmente sob o controle dos complexos ciclina D-CDK4/6 e, possivelmente, ciclina E-CDK2.

Se mitógenos são retirados do ciclo celular em qualquer ponto durante G_1 antes do ponto R, então os níveis da mais proeminente das ciclinas de tipo D – ciclina D1 – rapidamente declinam. Na ausência da ciclina D1, a pRb perde seus grupos fosfato pela ação de uma fosfatase ainda desconhecida e poderá converter-se em uma proteína que não mais constitui-se em um bom substrato para os complexos ciclina E-CDK2. Esse tipo de resposta chama a atenção para a necessidade de sinais mitogênicos contínuos e de grande magnitude desde a fase inicial até a metade de G_1 e daí ao ponto R.

Figura 8.22 Controle da transição pelo ponto de restrição por mitógenos Os níveis das ciclinas tipo D são amplamente controlados por sinais extracelulares. As ciclinas tipo D, agindo com suas parceiras CDK4 e CDK6, são capazes de levar à hipofosforilação de pRb – um pré-requisito para a transição pelo ponto R – o que faz com que essa transição se torne sensível a sinais extracelulares (veja também a Figura 8.15). Esses processos são estendidos pelas ações dos complexos ciclina-E-CDK2 sobre a pRb hipofosforilada, que procede a fim de completar o trabalho de inativação da pRb por meio de sua hiperfosforilação, que resulta em completa inativação funcional.



Uma vez que a célula avança através do ponto R, a hiperfosforilação continuada e a inativação funcional da pRb são aparentemente sustentadas e aumentadas pelas ciclinas E, A e então pela ciclina B contendo complexos CDK, nenhuma delas respondendo, nessas condições, a sinais extracelulares – precisamente as propriedades da maquinaria do relógio do ciclo celular que, imagina-se, opera após a transição do ponto R e garante a execução das rigidamente programadas séries de transições em S, G₂ e M.

Esse esquema revela por que a pRb é tão crítica na regulação da proliferação celular. Se a célula não puder contar com sua atividade (por meio de mutações nas cópias cromossômicas do gene *Rb*, metilação do promotor do gene *Rb* ou ações de oncoproteínas tumorais de vírus de DNA), então a pRb não mais servirá como a guardiã do portão do ponto R. Além disso, como será visto, em alguns tipos de câncer, a fosforilação de pRb está desregulada, resultando na fosforilação inapropriada e, assim, na pRb funcionalmente inativada. Em outras células cancerosas, existem evidências sugerindo que a desfosforilação (e conseqüente ativação) da pRb, que normalmente ocorre na transição de M para G₁ por meio da ação da fosfatase PP1, nunca ocorre, deixando pRb no seu estado inativo hiperfosforilado durante todo o ciclo de crescimento e divisão dessas células. Sem a pRb ativa as células passam pela fase G₁ até S sem contar com os controles usuais desenhados para assegurar que o avanço pelo ciclo celular ocorrerá somente se certas pré-condições forem satisfeitas. De fato, como será visto, a falta de regulação na fosforilação da pRb é tão difundida que leva a crer que o comprometimento dessa importante rota de sinalização está envolvido em virtualmente todos os tipos de tumores humanos.

As atividades da pRb parecem se confundir com aquelas de suas proteínas-primas, p107 e p130, o que nos leva a perguntar por que a pRb é a única dessas três a ter um claro e óbvio papel na patogênese do câncer. Uma resposta definitiva para esse enigma ainda não existe. Talvez a resposta venha dos momentos específicos durante o ciclo celular quando essas duas proteínas relacionadas à pRb estão ativas (veja a Barra lateral 8.4 e a Figura 8.21B). Ao passo que a p130 é especializada em suprimir a proliferação celular enquanto a célula permanece em G₀, a p107 parece ser mais ativa na fase tardia de G₁ e a fase S. Somente a pRb está bem-situada no controle da transição através do ponto R de crescimento dependente de sinais mitóticos para crescimento não-dependente de sinais mitóticos.

8.7 Fatores de transcrição E2F permitem à pRb decidir entre crescer e permanecer quiescente

Como descrito anteriormente, um grande número de linhas de evidência indicam que a hipofosforilação da pRB suprime o avanço por G₁ e que pRb perde essa habilidade quando se torna hiperfosforilada. Além disso, esse comportamento não fornece qualquer evidência de como a pRB impõe tal controle. Pesquisas conduzidas no início da década de 1990 indicaram que a pRB exerce muito desse controle por meio de seus efeitos em um grupo de fatores de transcrição chamados E2Fs.

Quando a pRB (e suas duas primas, p107 e p130) estão no seu estado não-fosforilado ou hipofosforilado, elas se ligam às E2Fs, incluindo as E2Fs que estão ligadas ao DNA; entretanto, quando hiperfosforiladas, a pRB e suas primas (as três proteínas tipo *pocket*; veja a Figura 8.21) dissociam-se das E2Fs (Figura 8.23A). Esse modelo sugere um modelo simples de como a pRB é capaz de controlar o avanço pelo ciclo celular. No início e metade da fase G₁, as E2Fs estão associadas aos promotores de vários genes sob seu controle. Ao mesmo tempo, esses fatores de transcrição estão ligados a proteínas tipo *pocket*. Essa associação com as proteínas tipo *pocket* evita que as E2Fs ajam como estimuladores da transcrição. Da mesma forma, durante a maior parte da fase G₁ do ciclo celular, genes que dependem das E2Fs para sua expressão permanecem reprimidos. Entretanto, quando as proteínas tipo *pocket* sofrem hiperfosforilação no ponto R ou na fase tardia de G₁, elas liberam seu conteúdo nas E2Fs, permitindo-lhes estimular a transcrição dos genes sob seu controle. Os produtos desses genes, por sua vez, conduzem a célula da fase tardia de G₁ para a fase S. Similarmente, quando oncoproteínas virais estão presentes, elas mimetizam a hiperfosforilação da pRB, impedindo-a de ligar-se às E2Fs (Figura 8.23B).

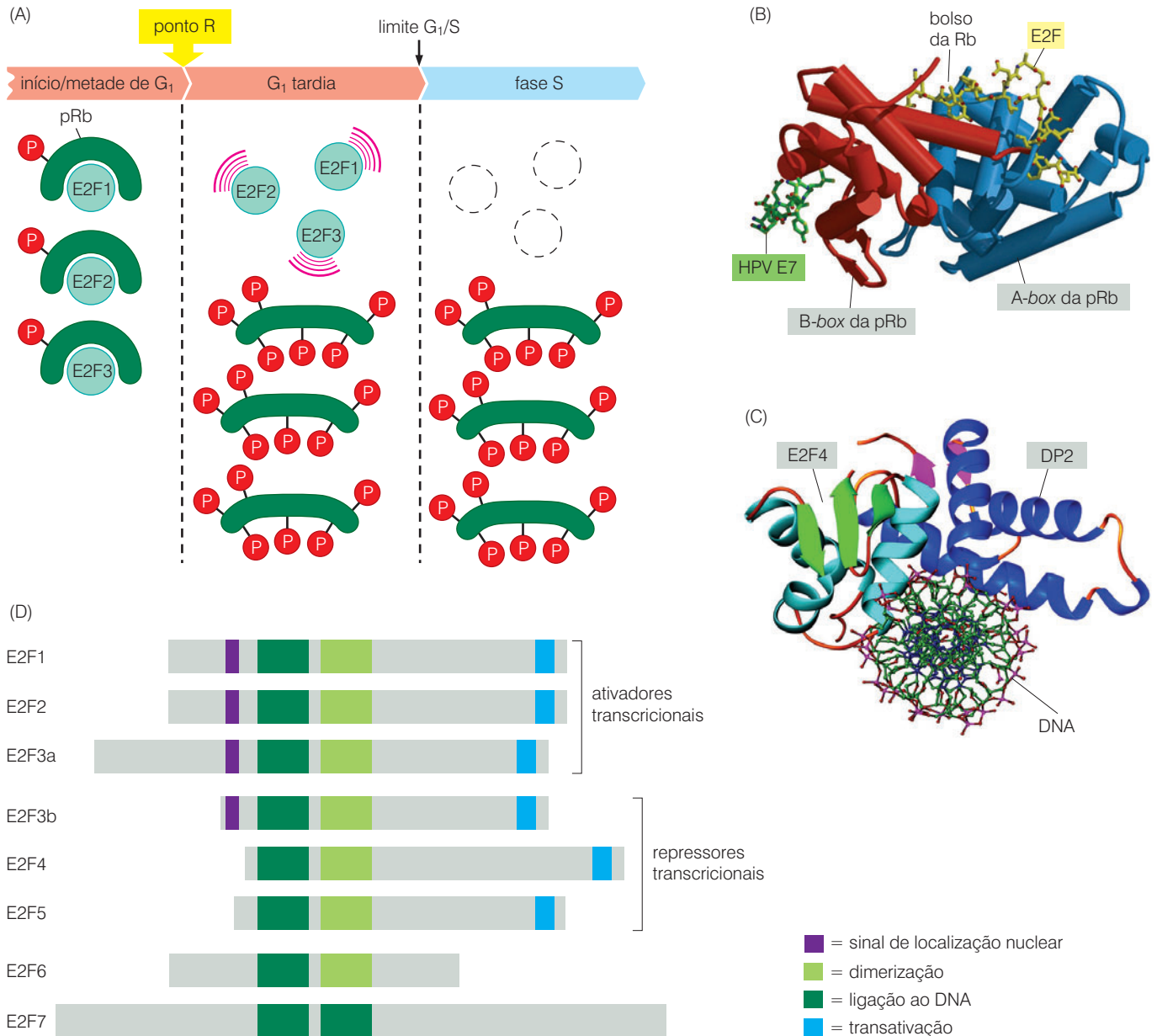


Figura 8.23 E2Fs e suas interações (A) Ao ligarem-se a vários fatores de transcrição E2F, as três proteínas tipo *pocket*, pRb, p107 e p130, modulam a expressão dos genes respondentes a E2F em várias fases do ciclo celular. Quando a pRb liga-se a E2Fs 1, 2 e 3 (à esquerda), ela bloqueia seu domínio de ativação da transcrição; outras proteínas que servem para modificar a cromatina e reprimir a transcrição (*não-mostrado*) são atraídas para os complexos pRb-E2F. Uma vez que eles estão ligados aos promotores de certos genes através das E2Fs, esses complexos multiprotéicos reprimem a expressão desses genes. (O comportamento da p107 e da p130, *não-mostrado*, é semelhante àquele da pRb.) Após sua hiperfosforilação no ponto R, as proteínas do tipo *pocket* liberam as E2Fs de seu jugo, permitindo-lhes ativar a transcrição desses genes. À medida que as células adentram a fase S (à direita), as E2Fs são inativadas e/ou degradadas. Assim, as E2Fs podem funcionar como indutores ativos da transcrição somente na curta janela de tempo da fase tardia de G₁ que começa no ponto R e termina logo após as células entrarem na fase S. (B) A ligação de E2Fs tal como a E2F2 (*bastão amarelo*) pela pRb (*vermelho e azul*) é evitada por várias oncoproteínas virais. Aqui podemos ver como um segmento da oncoproteína E7 do papilomavírus humano (*bastão verde*, à esquerda) liga-se ao sulco raso da pRb (*domínio vermelho*, à esquerda;

também mostrado na Figura 8.21); essa ligação, juntamente a outros sítios de ligação secundários (ainda não-mapeados), perturba o “bolso” formado pelas caixas B (*vermelho*) e A (*azul*) da pRb, assim evitando a ligação do domínio ativador de transcrição do E2F2 localizado no C-terminal (*amarelo*) a esse bolso. Essa perda da ligação de E2F efetivamente neutraliza a habilidade de pRb de inibir o avanço pelo ciclo celular. Hélices α são mostradas aqui como *cilindros*. (C) Os fatores de transcrição E2F ligam-se ao DNA como complexos heterodiméricos com companheiras de DP. Aqui, a ligação de um complexo E2F4-DP2 à dupla hélice do DNA (*figura em bastão, verde-escuro e vermelho*) é revelada por cristalografia de raios X. O fator de transcrição E2F4 é visto à esquerda (*azul-claro, verde*), enquanto a DP2 está à direita (*azul-escuro, rosa*), ambos apresentados como diagramas em fita. (D) As E2Fs constituem uma família de pelo menos sete proteínas distintas. E2Fs 1, 2 e 3a representam as E2Fs ativadoras de transcrição, enquanto a E2F3b (oriunda do *splicing* alternativo do pré-mRNA da E2F3a), a E2F4 e a E2F5 estão envolvidas na repressão da transcrição. As funções das E2Fs 6 e 7 são pouco conhecidas. (B, cortesia de Y. Cho, de C. Lee et al. *Genes Dev.* 16:3199-3212, 2002; C, cortesia de R. Latek, de N. Zheng et al. *Genes Dev.* 13:666-674, 1999; D, cortesia de A. Aslanian, P.J. Iaquineta, e J.A. Lees.)

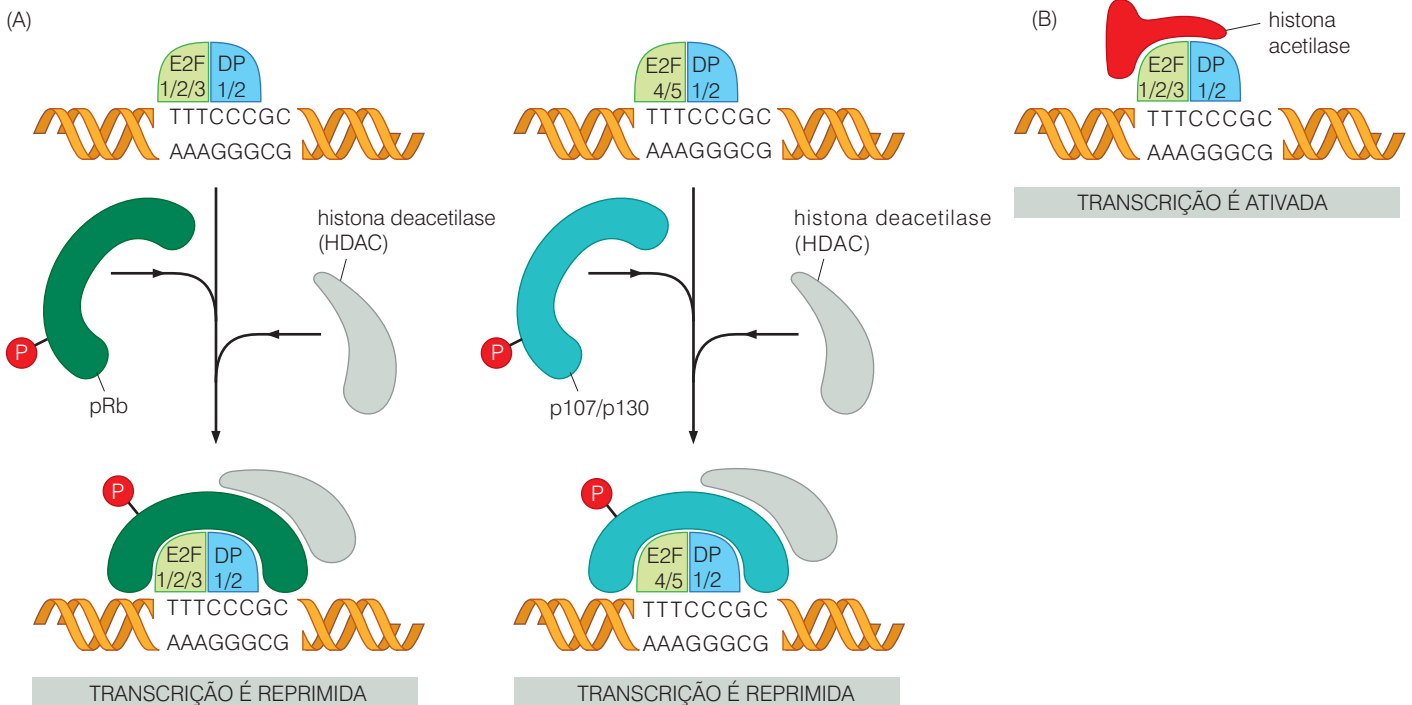
Apesar de o delineamento apresentado anteriormente estar correto em sua estrutura, os detalhes são mais interessantes e complexos. O termo “E2F” é atualmente conhecido como membro de uma classe de proteínas heterodiméricas composta pelas subunidades E2F1, 2, 3, 4, 5 e 6, todas elas capazes de ligar-se a subunidade DP1 ou DP2 (Figura 8.23C e D); as funções de um outro membro desta família – E2F7 – não são bem-conhecidas. (Nas discussões que se seguem, descreveremos o comportamento das várias subunidades de E2F, com associação às subunidades DP1 ou DP2 sendo assumida.) Uma vez montados, os complexos E2F-DP reconhecem e ligam-se a uma sequência consenso nos promotores de vários genes, sequência essa que parece ser TTTCCCGC ou pequenas variações dela.

Neste livro, retratamos fatores de transcrição como proteínas que se ligam aos promotores de genes e então ativam a transcrição. De fato, fatores de transcrição operando como os E2Fs podem exercer dois efeitos contrários no controle da transcrição. Quando ligados aos promotores de genes na ausência de quaisquer proteínas tipo *pocket* associadas (i. e., pRB, p107 ou p130), E2Fs como as E2Fs 1, 2 e 3 podem de fato acionar a expressão gênica pelo recrutamento de outras proteínas que agem na remodelação da cromatina e acionam a RNA polimerase para iniciar a transcrição.

Figura 8.24 Modificação da cromatina por proteínas tipo *pocket* (A) A pRB hipofosforilada desencoraja a transcrição por meio da atração da enzima histona deacetilase (HDAC) (cinza) para os complexos pRb-E2F que estão ligados a promotores gênicos; essas enzimas impedem a transcrição pela remoção dos grupos acetil das histonas circunjacentes, fazendo com que estas últimas mudem sua configuração para outra incompatível com a progressão da RNA polimerase pela cromatina. (B) Contrariamente, quando as E2Fs não se encontram complexadas com a pRb (ou suas proteínas-primas p107 e p130), elas atraem histonas acetilases (vermelho), que posicionam a cromatina em uma configuração que é favorável à transcrição.

Entretanto, quando a pRB está hipofosforilada, ela associa-se fisicamente à sua E2F correspondente. Nesse momento, ambas já estão em contato com os promotores de vários genes e aí permanecem após a ligação à pRB. Uma vez ligadas a essas E2Fs, as moléculas da pRB hipofosforiladas bloqueiam o domínio de *transativação* das E2Fs que é por elas utilizado para ativar a transcrição (Figura 8.23D). Ao mesmo tempo, a pRB recruta ativamente outras proteínas que reprimem a transcrição. Uma importante maneira de fazê-lo, mas não a única, é recrutar a histona deacetilase (HDAC) para esse complexo; pela remoção de grupos acetil das moléculas de histona das proximidades, uma HDAC remodela a cromatina de tal forma que sua configuração é incompatível com a transcrição ativa (Figura 8.24A).

Isso significa que, em adição ao bloqueio físico dos domínios de transativação das E2Fs, a pRB ativamente funciona como um repressor da transcrição. As E2Fs 4 e 5 parecem estar primariamente envolvidas na repressão de genes que agem por meio da associação às proteínas



p107 e p130 para atrair repressores de transcrição aos promotores, com isso bloqueando a expressão gênica. A E2F6, que não se associa a proteínas tipo *pocket*, parece agir exclusivamente como repressora da transcrição.

Em células quiescentes da fase G_0 , por exemplo, a E2F4 e a E2F5 estão presentes em abundância (e encontram-se associadas à p130), enquanto E2Fs 1, 2 e 3 estão praticamente ausentes, sendo fundamentalmente expressadas nas células em proliferação. Além disso, células que foram geneticamente desprovidas de E2F4 e E2F5 perderam sua capacidade de resposta aos efeitos inibidores do crescimento do inibidor de CDK p16^{INK4A}. Isso significa que os efeitos que resultam da inibição do complexo ciclina D-CDK4/6 e o bloqueio da fosforilação das proteínas do tipo *pocket* são mediados pela ligação de p107 e p130 a essas duas E2Fs. Essa ligação resulta na repressão de uma série de genes que têm seqüências TTTCCCGC nos seus promotores.

Uma vez hiperfosforilada, a pRb libera seu conteúdo nos complexos E2F, e estes, por sua vez, podem atrair proteínas ativadoras da transcrição, como acetilases de histona, que modificam as histonas e conferem a elas uma configuração que favorece a transcrição (Figura 8.24B). Uma série de genes que são expressos especificamente na fase tardia de G_1 e que são sabida ou assumidamente importantes para a entrada na fase S contêm sítios de ligação para as E2Fs em seus promotores. Dentre esses, estão alguns genes que codificam proteínas envolvidas na síntese de nucleotídeos precursores de DNA (como a diidrofolato sintetase e a timidina cina-se), bem como outros genes envolvidos diretamente na replicação do DNA.

Importante dentre os genes ativados por E2F, está o gene que codifica para ciclina E. Conseqüentemente, os níveis tanto de mRNA de ciclina E como da proteína ciclina E aumentam rapidamente após a passagem pelo ponto R. Lembre-se que a ciclina E é responsável, juntamente com a CDK2, por levar à hiperfosforilação de pRb. Assim, a inativação da pRB leva a um aumento nos níveis da ciclina E, e esta, uma vez formada, leva à inativação de pRb (Figura 8.25A). Essas relações permitem as operações de uma poderosa alça de retroalimentação positiva que é acionada à medida que as células ultrapassam o ponto R. (Essa regulação também pode ser chamada de “alça de alimentação *forward*”).

Uma segunda alça de retroalimentação positiva é acionada simultaneamente no ponto R por meio do seguinte mecanismo: Complexos de ciclina E-CDK2 fosforilam a p27^{Kip1}, e esta, uma vez fosforilada, é ubiquitinada e rapidamente degradada (Figura 8.25B). A destruição das moléculas de p27^{Kip1} que normalmente inibem a ciclina E-CDK2 libera complexos de ciclina E-CDK2 adicionais que promovem a fosforilação e, conseqüentemente, inativam mais moléculas de p27^{Kip1}. Esses mecanismos de retroalimentação positiva operam em muitos circuitos de controle para garantir a rápida execução de uma decisão uma vez que ela tenha sido tomada. Importante também, eles asseguram que a decisão tomada será essencialmente irreversível – uma situação que corresponde precisamente ao comportamento de células avançando pelo ponto R.

O período de promoção de transcrição ativa pelas E2Fs 1, 2 e 3 parece ser de curta duração (veja a Figura 8.23A). Essa janela de tempo começa no ponto R quando a pRb torna-se hiperfosforilada e libera as E2Fs. As três E2Fs liberadas então induzem a expressão de genes críticos da fase tardia de G_1 . Os produtos desses genes são necessários para preparar a célula para sua entrada na fase S, como descrito anteriormente. Logo após, à medida que a célula ultrapassa o ponto de transição de G_1/S para a fase S, a ciclina A torna-se ativada e, agindo em conjunto com a sua parceira CDK2, fosforila ambas, a E2F e as subunidades de DP desses fatores de transcrição heterodiméricos. Isso resulta na dissociação dos complexos E2F-DP e na conseqüente perda da sua habilidade de ativar a transcrição. Ao mesmo tempo, E2F1 (e possivelmente outras E2Fs) é marcada para sofrer degradação por meio da ubiquitinação, e a E2F7, que parece agir antagonizando a ativação gênica mediada por E2F, é expressa e parece bloquear qualquer expressão gênica residual dependente da E2F que ainda persista após a entrada na fase S. Em conjunto, essas mudanças efetivamente bloqueiam a ativação transcricional mediada pelos fatores E2F, cujo rápido momento de glória como fatores de transcrição ativos ocorrerá novamente somente no final da fase G_1 do próximo ciclo celular.

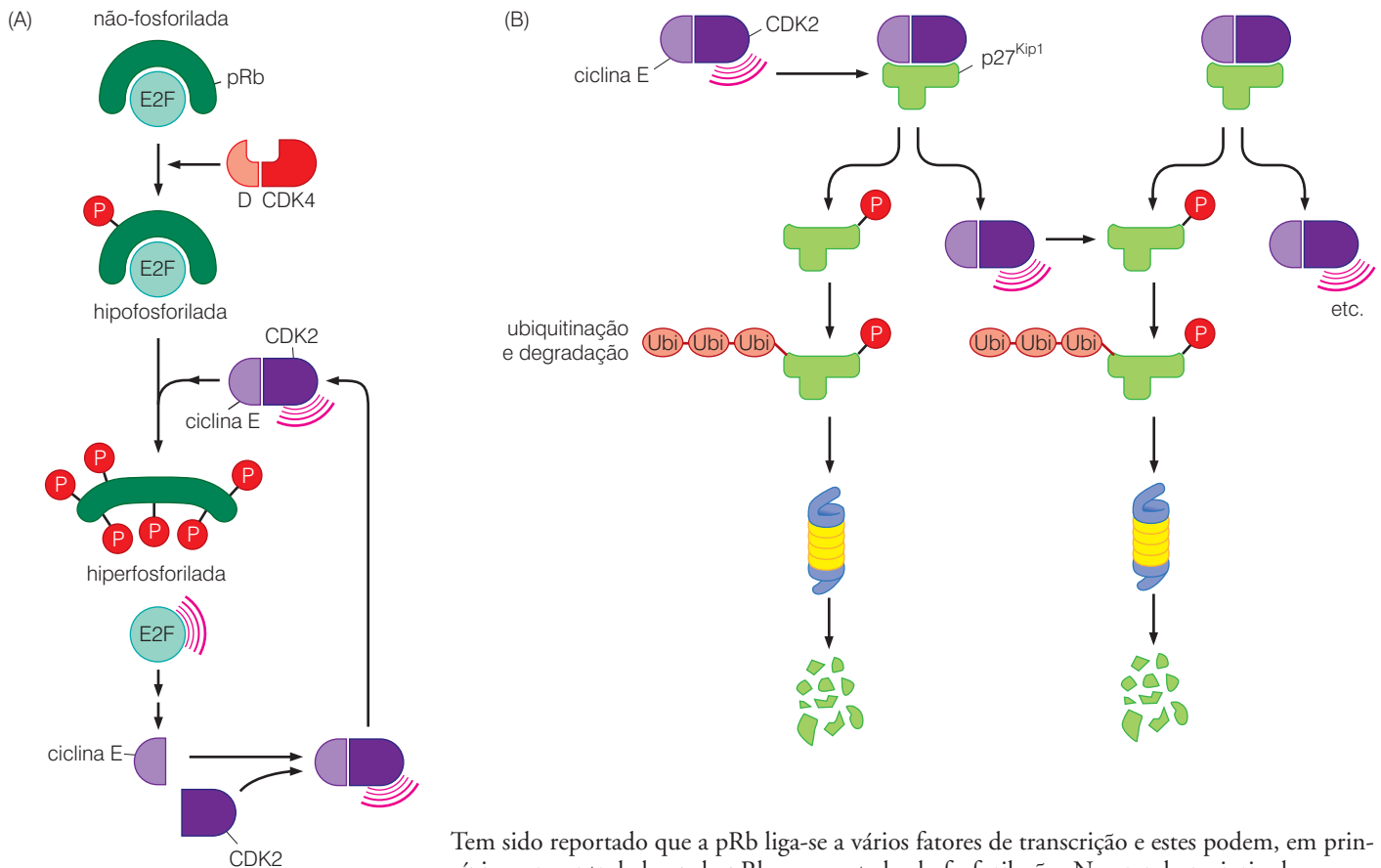


Figura 8.25 Alças de retroalimentação positiva e a irreversibilidade do avanço do ciclo celular. A irreversibilidade de certas etapas-chave da progressão do ciclo celular e a rapidez de sua execução são asseguradas, em parte, pela ativação de certas alças de retroalimentação positiva. (A) A hiperfosforilação de pRb promovida por complexos E-CDK2 libera os fatores de transcrição E2F do controle da pRb, permitindo às E2Fs desencadear aumentada transcrição dos genes da ciclina E; isso leva à síntese de mais proteína da ciclina E e à formação de mais complexos E-CDK2, que funcionam para induzir mais fosforilação da pRb. (B) A ativação de um número pequeno de complexos E-CDK2 permite a estes fosforilar a p27^{Kip1}, marcando-a para ubiquitinação. Essa p27^{Kip1} é então degradada, liberando mais complexos E-CDK2 da inibição pela p27^{Kip1}, permitindo a tal processo repetir-se e amplificar seus efeitos.

Tem sido reportado que a pRb liga-se a vários fatores de transcrição e estes podem, em princípio, ser controlados pela pRb e seu estado de fosforilação. Na grande maioria dos casos, entretanto, uma análise funcional detalhada das suas interações com a pRb não foram conduzidas. Existem fortes razões para se acreditar que, dentre todos esses fatores de transcrição relacionados à pRb, as E2Fs são de importância fundamental no controle do avanço pelo ciclo celular: quando a proteína E2F1 é microinjetada em certos tipos de células quiescentes mantidas em meios de cultura sem soro, e que por conseguinte encontram-se em G₀, esse fator de transcrição é capaz de induzir por si só essas células a entrar em G₁ e avançar em direção à fase S; o mesmo observa-se com a E2F2 e a E2F3.

8.8 Várias rotas de sinalização mitogênicas controlam o estado de fosforilação de pRb

No decorrer deste capítulo, foi enfatizado que várias rotas de sinalização distintas convergem no relógio do ciclo celular, modulando sua função. Atuando como uma central de comando, a maquinaria do ciclo celular coleta e processa esses sinais *aferentes* e então, agindo por meio dos complexos ciclinas-CDK, emite os sinais que estimulam o avanço pelo ciclo celular (veja a Figura 8.1). É importante voltar e resumir as várias maneiras pelas quais esses sinais regulam componentes distintos do relógio do ciclo celular. Fundamentais dentre os sinais emergentes nesse sistema de regulação nuclear, são as rotas de sinalização mitogênicas. Como existe um grande número de sinais sendo gerados por essas rotas em células tumorais, as conexões entre tais rotas e o relógio do ciclo celular são críticas na compreensão da transformação de células e patogênese tumoral.

Sinais mitogênicos transmitidos através de Ras resultam na hipo e, eventualmente, hiperfosforilação de pRb. Essa fosforilação é iniciada pela indução da expressão de genes que codificam ciclinas do tipo D, mais notavelmente a ciclina D1. Quando a sinalização mediada pela Ras é bloqueada (pela introdução de uma proteína Ras mutante **dominante negativa**), a proliferação celular é bloqueada em células selvagens expostas ao soro,

enquanto células mutantes $Rb^{-/-}$ que não tem a função de Ras progridem para a fase S normalmente. Isso demonstra que a principal função da Ras durante a fase G_1 é assegurar que os sinais mitogênicos gerados por receptores para fatores de crescimento ativados por ligantes causem fosforilação e inativação de pRb. Além disso, o bloqueio da progressão para a fase S imposto pela proteína Ras dominante negativa pode ser evitado pela expressão ectópica dos genes da ciclina E ou do E2F1 nas células. Em conjunto, isso sugere uma cadeia linear de comando como segue:

fatores de crescimento \rightarrow receptores para fatores de crescimento \rightarrow Ras \rightarrow
ciclina D1 e E1 \rightarrow inativação de pRb \rightarrow ativação das E2Fs \rightarrow entrada na fase S

A habilidade dos fatores de crescimento mitogênicos em aumentar os níveis de ciclinas tipo D depende de várias rotas de sinalização distintas (Figura 8.26; veja também a Seção 8.3 e a Tabela 8.1). Destes, o sinal mais estudado flui através das vias Ras \rightarrow Raf \rightarrow MAPK (Seção 6.5). Por exemplo, membros da família de fatores de transcrição Fos, que encontram-se na base dessa cascata de sinalização (Tabela 6.1), criam os fatores de transcrição heterodiméricos AP-1 formando complexos com proteínas Jun; esses complexos AP-1 são conhecidos por serem poderosos ativadores da transcrição do gene da ciclina D1. Além disso, uma série de proteínas citoplasmáticas transdutoras de sinal gerado age sobre o promotor da ciclina D1 de forma ainda pouco compreendida (veja a Tabela 8.1). Como mencionado anteriormente (Seção 8.3), os promotores das ciclinas D2 e D3 têm seu próprio leque de reguladores localizados *upstream* que respondem a certos sinais extracelulares. Muitas das rotas de sinalização que levam à ativação desses dois promoto-

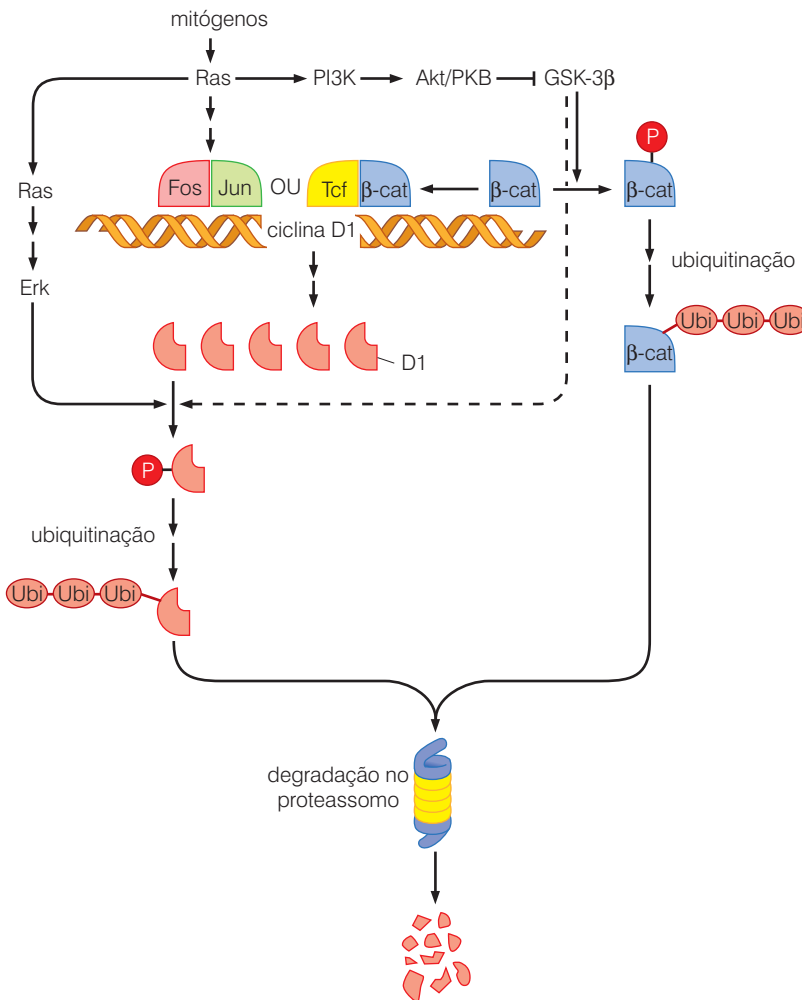


Figura 8.26 Controles de contrabalanceamento dos níveis da ciclina D1. Várias rotas de sinalização de transdução de sinais mitogênicos modulam os níveis da ciclina D1. Por exemplo, a rota de sinalização da Ras influencia os níveis da ciclina D1 de três diferentes maneiras. Primeiro, o fator de transcrição AP-1 age sobre o promotor da *ciclina D1*, levando a um aumento nos níveis de mRNA da ciclina D1; AP-1 é composta por heterodímeros Fos-Jun, os quais estão aumentados e/ou funcionalmente ativados por mitógenos (no centro, acima; veja também a Figura 8.11). Segundo, por meio da ativação da PI3 cinase e, assim, da Akt/PKB, Ras é capaz de inibir as ações da GSK-3β. Isso, por sua vez, livra a β-catenina (β-cat) da fosforilação, ubiquitinação e degradação, permitindo a ela combinar-se com o fator de transcrição Tcf para induzir a transcrição da *ciclina D1*. Terceiro, operando em direção oposta está a Erk, que se encontra no final da cascata Ras \rightarrow Raf \rightarrow MEK \rightarrow cinase Erk (Seção 6.5). A ciclina D1 é fosforilada por Erk (à esquerda) e, com isso, marcada para ubiquitinação e degradação em proteassomos. Uma quarta conexão foi também relatada, que envolve a fosforilação da ciclina D1 pela GSK-3β, que também resulta em sua ubiquitinação e degradação (linha pontilhada); mais uma vez, a ação de Ras favorece o acúmulo da ciclina D1. (Em geral, a força da rota da Ras para aumentar os níveis da ciclina D1 parece exceder seus efeitos de degradação da ciclina D1.)

res de genes são também negativamente regulados em células cancerosas humanas, levando, com isso, a excessiva expressão de uma ou mais dessas ciclinas do tipo D, fosforilação inapropriada e inativação de pRb e descontrole da proliferação.

A ativação da rota de sinalização Ras também leva, por meio do fosfatidilinositol-3 cinase (PI3K), à ativação da cinase Akt/PKB. Esta última fosforila e inativa a glicogênio sintase cinase-3 β (GSK-3 β , Seção 6.10, veja a Figura 8.26). Tal evento tem vários benefícios para a promoção do crescimento. Em geral, a GSK-3 β age sobre moléculas de catenina- β destruindo-as por meio de sua fosforilação. Essa fosforilação resulta na ubiquitinação das moléculas de catenina- β e sua posterior destruição por proteassomas. Entretanto, quando GSK-3 β é inativada pela fosforilação de Akt/PKB, as cateninas- β podem sofrer acúmulo e migrar para o núcleo, onde formam complexos de transcrição com Tcf/Lef que estimulam a transcrição da ciclina D1. Possivelmente, fatores de crescimento Wnt (Seção 6.10) tenham um efeito similar sobre o ciclo celular graças à sua capacidade de suprimir a atividade de GSK-3 β .

Outros fatores mitogênicos tornam esse processo ainda mais complexo pela geração de sinais mitogênicos que afetam componentes específicos do ciclo celular. Por exemplo, por razões ainda pouco conhecidas, a exposição continuada a fatores de crescimento do soro causa degradação do inibidor de CDK p27^{Kip1}, resultando no declínio progressivo dos níveis dessa proteína à medida que a célula avança pela fase G₁ do ciclo celular. (Esse processo de perda de moléculas de p27^{Kip1} pela célula parece cooperar com o seqüestro de p27^{Kip1} mediada por complexos da ciclina D1-CDK4/6 [veja a Figura 8.17] a fim de liberar algumas moléculas da ciclina E-CDK2 da inibição por p27^{Kip1}, um evento observado na fase tardia de G₁ que promove o início explosivo da transição pelo ponto R.)

Existem ainda outros mecanismos pouco caracterizados que permitem aos fatores mitogênicos de crescimento energizar o aparato do ciclo celular. Por exemplo, a associação física das ciclinas do tipo D com a CDK4 também é dependente, por razões desconhecidas, da sinalização mitogênica. A elucidação dessas e outras conexões entre sinais promotores de crescimento e o relógio do ciclo celular virão a partir de pesquisas futuras.

8.9 A oncoproteína Myc perturba a decisão de fosforilar a pRb afetando o controle da progressão do ciclo celular

Na seção anterior, foi descrito como o excesso de sinais mitogênicos fluindo pelas células cancerosas leva a níveis elevados de ciclinas do tipo D, com a conseqüente fosforilação e inativação funcional de pRb. Antes dessa discussão, já havíamos comentado a respeito de duas outras maneiras pelas quais a função da pRb é comprometida em células humanas neoplásicas: a função da pRb pode ser perdida por meio de mutação do gene *Rb*, tal como ocorre em retinoblastomas, osteossarcomas e carcinomas pulmonares de células pequenas. Um quadro funcionalmente similar pode ser visto em células infectadas e transformadas com o papilomavírus humano (HPV); a ligação da oncoproteína viral E7 à pRb (veja as Figuras 8.21C e 8.23 B) tem um papel de destaque no desenvolvimento da grande maioria (> 99,7%) dos carcinomas cervicais. Como veremos a seguir, o câncer em humanos vale-se de uma série de outras estratégias para desorganizar o controle da progressão do ciclo celular.

Começaremos com a proteína Myc, a qual, quando expressada de forma descontrolada, opera como uma oncoproteína. A expressão do gene *Myc* está desregulada em 15 a 30% dos casos de câncer humano, levando a um aumento nos níveis da proteína Myc. A oncoproteína Myc funciona muito diferentemente da maioria das oncoproteínas descritas nos Capítulos 4, 5 e 6. Estas outras, como a Ras e Src, operam proximamente às membranas citoplasmáticas e ativam cascatas de sinalização complexas que, por sua vez, mobilizam proteínas citoplasmáticas de transdução de sinal e, por fim, fatores de transcrição nucleares. A Myc é encontrada no núcleo, no qual funciona como um fator de transcrição promotor de crescimento.

A Myc faz parte da família dos fatores de transcrição bHLH. Seu nome deriva de sua estrutura tridimensional compartilhada, que inclui um domínio de ligação de DNA básico seguido por seqüências de aminoácidos que formam uma α -hélice, uma alça (do inglês *loop*) e, por fim, outra α -hélice. Os membros dessa família de fatores de transcrição formam homo e heterodímeros com eles próprios e com outros membros da família. Tais complexos diméricos associam-se então a seqüências reguladoras chamadas E-boxes (compostas pela seqüência CACGTG), encontradas nos promotores dos genes-alvo que elas regulam (Figura 8.27).

No caso particular de Myc, as suas ações são determinadas por seus próprios níveis, bem como por suas associações a proteínas bHLH parceiras que podem tanto aumentar como suprimir sua função como um fator ativador de transcrição. A fosforilação de Myc também modula seu funcionamento e estabilidade. Quando Myc associa-se a Max – um membro colaborador da família bHLH que potencializa seu potencial de ativação da transcrição –, gera-se o fator de transcrição heterodimérico Myc-Max, o qual, por sua vez, regula a expressão de inúmeros genes cujos produtos têm efeitos potentes sobre o ciclo celular, favorecendo a proliferação celular.

(Enquanto os níveis de Myc são bastante influenciados por sinais mitogênicos, os níveis de Max são mantidos relativamente constantes dentro das células. Da mesma forma, quando células normais são cultivadas na presença de mitógenos do soro, Myc acumula-se substancialmente; em contrapartida, os níveis de Myc colabam na ausência de componentes mitogênicos. Isso significa que os níveis do heterodímero Myc-Max são continuamente controlados pelo fluxo de sinais mitogênicos que as células normais estão recebendo.)

Como será descrito mais adiante, algumas proteínas bHLH estão também envolvidas na orquestração de certos programas de diferenciação específicos para certos tipos de tecidos. Por meio de intermediários, Myc pode evitar que esses outros fatores de transcrição bHLH levem a cabo vários programas de diferenciação. Como consequência, Myc pode simultaneamente promover a proliferação celular e bloquear a diferenciação; esse é o tipo de comportamento biológico que está associado a células em crescimento ativo que ainda não entraram em uma fase diferenciada, pós-mitótica. Entretanto, quando as células reduzem sua proliferação e tornam-se diferenciadas, os complexos Myc-Max desaparecem, uma vez que o aumento da proteína Mad (outro fator colaborador da bHLH) destaca Myc dos complexos Myc-Max previamente formados (veja a Figura 8.27). Os complexos Myc-Max resultantes funcionam então como repressores da transcrição, permitindo às células em muitos tecidos humanos adentrar um estado pós-mitótico diferenciado.

Myc interage intimamente com a maquinaria do ciclo celular. Talvez a primeira evidência apontando para essa direção tenha vindo de observações nas quais pares de oncogenes cola-

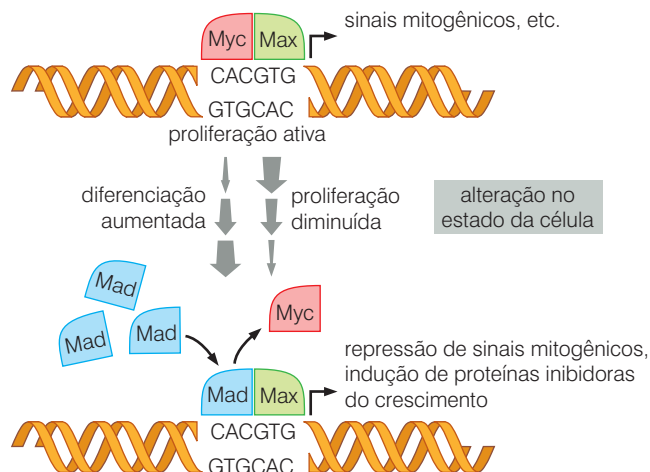
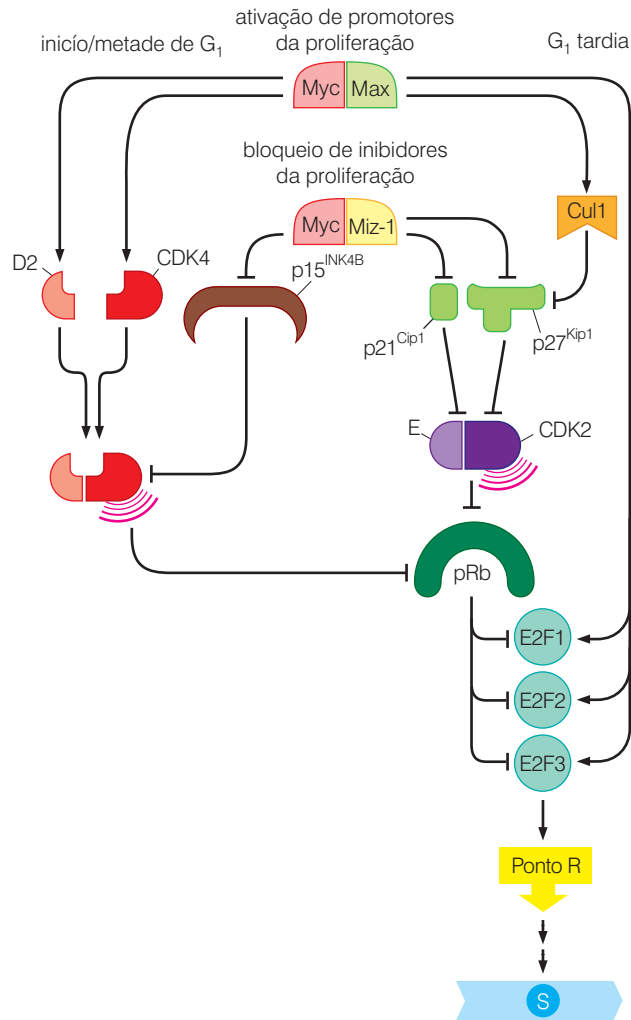


Figura 8.27 O fator de transcrição Myc pertence a uma família de fatores de transcrição bHLH (hélice-volta-hélice básica) que agem como heterodímeros para modular a transcrição de um grande grupo de genes-alvo que possuem seqüências do tipo E-box. Complexos Myc-Max agem para promover a transcrição, enquanto os complexos Mad-Max atuam para reprimir a transcrição da maioria dos genes. À medida que as células diferenciam-se, os níveis de Mad aumentam progressivamente, e Myc é deslocada por Mad, resultando no desaparecimento dos complexos Myc-Max que, de outra forma, promoveriam o bloqueio da diferenciação.

Figura 8.28 Ações de Myc no relógio do ciclo celular A proteína Myc, agindo com seu parceiro Max (*topo*), pode modular as ações de vários reguladores positivos e negativos do avanço pelo ciclo celular. Por exemplo, o heterodímero Myc-Max é capaz de induzir a expressão das proteínas promotoras de crescimento, as ciclinas D2 e CDK4 (à esquerda), que podem promover o avanço até a fase inicial de G₁. Ao mesmo tempo, pelo aumento da expressão de *Cul1* (que é responsável pela degradação do inibidor de CDK p27^{Kip1}; à direita, *acima*), bem como E2Fs 1, 2 e 3 (à direita, *abaixo*), Myc favorece o avanço pela fase S. Além disso, Myc, agindo com sua parceira Miz-1, é capaz de reprimir a expressão dos inibidores de CDK p15^{INK4B}, p21^{Cip1} e p27^{Kip1}; mais uma vez, os efeitos se fazem sentir em ambos, início/metade e fase tardia de G₁.



boram entre si no processo de transformação de células de roedores para um estado tumorigênico. Revisitaremos o tópico colaboração entre oncogenes no Capítulo 11. Por enquanto, é suficiente dizer que os oncogenes *ras* e *myc* são importantes colaboradores na transformação de células, isso significando que cada um tem sua parcela de contribuição nesse processo. Similarmente, um oncogene *ras* colabora com o oncogene E1A do adenovírus na transformação celular. Em conjunto, essas observações indicaram que os oncogenes *myc* e E1A agiram analogamente nesse modelo experimental, embora o mecanismo pelo qual isso ocorra seja desconhecido.

O fato de que a oncoproteína E1A liga-se e inativa pRb, juntamente com suas primas p107 e p130 (Seção 8.5), sugeriu que a proteína Myc poderia ter efeitos similares sobre essas outras proteínas celulares vitais, especialmente pRb. Entretanto, uma associação direta entre Myc e pRb foi descartada. Em vez disso, constatou-se que Myc regula a expressão de vários outros componentes fundamentais para o relógio do ciclo celular. Quando a expressão desses componentes é dirigida pelos níveis anormalmente elevados de Myc presentes em células portadoras de oncogenes *myc*, o resultado é um estado fisiológico similar àquele visto em células deficientes para a função de pRb. Ambas as alterações privam a célula de um controle normal da progressão pela fase G₁ do seu ciclo celular e desregulam a passagem pelo ponto R.

Dentre os muitos alvos de Myc, encontra-se o gene da ciclina D2 (Figura 8.28), cuja expressão elevada leva à hipofosforilação de pRb. Myc também regula a expressão do gene CDK4, e os níveis elevados de CDK4 permitem a formação dos complexos ciclina-CDK4 que hipo-

fosforilam pRb e, ao mesmo tempo, seqüestram o inibidor de CDK p27^{Kip1}, liberando assim os complexos ciclina E-CDK2 da inibição (veja a Figura 8.17). Myc também dirige a expressão da proteína Cull1, que tem papel central na degradação de p27^{Kip1} por meio de sua ubiquitinação. De uma ou outra forma, essa expressão diferencial de genes dirigida por Myc serve para empurrar a célula em direção à fase G_1 do seu ciclo celular.

Pela associação com um segundo fator de transcrição, chamado Miz-1, Myc pode também funcionar como um repressor da transcrição (veja a Figura 8.28). Com essa função, Myc pode reprimir a expressão de genes que codificam os inibidores de CDK p15^{INK4B} e p21^{Cip1}, que bloqueiam a ação de CDK4/6 e CDK2, respectivamente. De fato, como veremos a seguir, o TGF- β utiliza-se desses dois inibidores de CDK para bloquear a progressão através da fase G_1 do ciclo celular. Assim, ao evitar a expressão desses dois inibidores de CDK, Myc confere resistência às ações de inibição de crescimento impostas pelo TGF- β . Este constitui um importante meio pelo qual células cancerosas podem continuar a proliferar sob condições (a presença de TGF- β nas redondezas) que normalmente afetariam de modo negativo a sua proliferação.

Finalmente, Myc é capaz de induzir a expressão de genes que codificam para as proteínas fatores de transcrição E2F1, E2F2 e E2F3. Como vimos anteriormente, esses fatores de transcrição E2F são negativamente regulados por pRb e suas duas proteínas primas. Ao induzir o acúmulo desses fatores de transcrição estimuladores do crescimento, Myc novamente desequilibra o sistema em favor da proliferação celular.

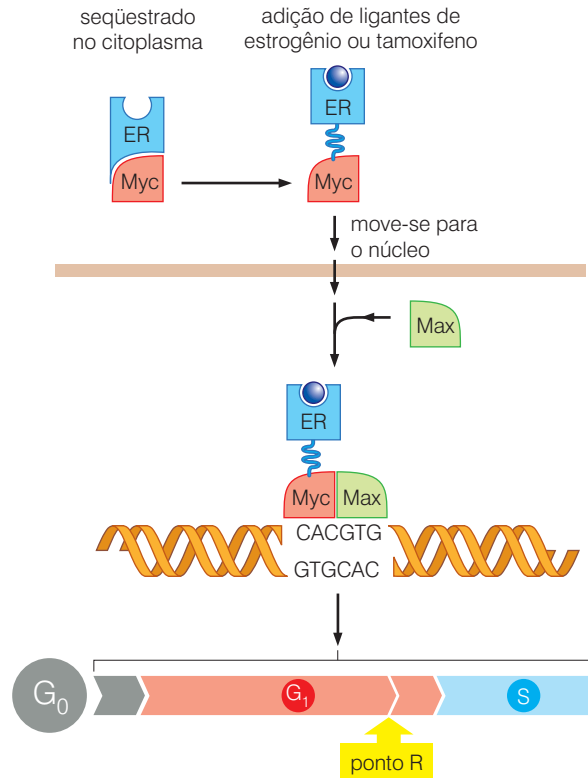
Agora começamos a entender como a oncoproteína Myc pode funcionar tão efetivamente no descontrole da proliferação celular. Myc é capaz de acionar várias alavancas regulatórias que fazem parte do relógio do ciclo celular. As mudanças resultantes nos níveis das proteínas-chave causam uma alteração no balanço dos mecanismos envolvidos na promoção e inibição do crescimento, favorecendo fortemente a inativação da pRb e o crescimento celular. Além disso, Myc pode, a longo prazo, também afetar a proliferação de linhagens celulares que são independentes de seus efeitos sobre o aparato do ciclo celular (Barra lateral 8.5).

Muitas das ações de Myc que perturbam o ciclo celular proporcionam uma explicação satisfatória de sua habilidade em desregular a proliferação e, assim, contribuir tão relevantemente para a patogênese do câncer. As ações da proteína Myc ilustram um princípio mais genérico da fisiologia celular que afeta muitos dos temas discutidos neste texto. Faz-se repetida referência ao fato de que uma proteína como a Myc “liga” e “desliga” seus alvos. Tal analogia representa uma simplificação do que realmente ocorre no interior das células. De fato, a maior parte dos reguladores não opera a partir do completo desligamento ou acionamento. Em vez disso, eles aumentam ou diminuem os níveis de seus alvos localizados *downstream*, com frequência aumentando-os. Com efeito, eles *zeram as chaves reguladoras*, mudando o balanço de sinais gerados de forma a favorecer ou limitar certa resposta celular.

Talvez a demonstração mais ilustrativa do potencial mitogênico de Myc tenha emergido de um experimento no qual Myc é modificado para ser expresso em níveis elevados e constantes como uma proteína de fusão que é formada juntamente com o receptor para estrogênio (ER). Na ausência do ligante do receptor para estrogênio (ER), como o estrogênio propriamente dito ou tamoxifeno, a proteína de fusão Myc-ER é seqüestrada em um estado inativo no citoplasma. Entretanto, com a adição do ligante, essa proteína de fusão é liberada, sofre translocação para o núcleo e opera como um fator de transcrição Myc normal. Na fase de quiescência, células privadas de soro (na fase G_0) expressando a proteína de fusão Myc-ER são tratadas com estrogênio ou tamoxifeno (mas deixadas em meio de cultura deficiente de soro); essas células são induzidas a entrar em G_1 e progredir para a fase S (Figura 8.29). Isso ilustra o fato de que Myc, atuando por si só e na ausência de mitógenos associados ao soro, é capaz de livrar a célula das restrições impostas na fase G_0 e fazê-las progredir para G_1 — um avanço que normalmente exige estimulação com fatores de crescimento. Além de Myc, vários outros fatores de transcrição apresentam ampla abrangência e efeitos das oncoproteínas (Barra lateral 8.6).

Barra lateral 8.5 Myc também pode exercer efeitos a longo prazo sobre a proliferação celular Como vimos, a oncoproteína Myc pode agir dinamicamente para desregular a maquinaria do relógio do ciclo celular, facilitando assim o trânsito das células através de seus ciclos de crescimento e divisão. Myc pode também afetar a proliferação celular de forma não-relacionada. Mais adiante, no Capítulo 10, aprenderemos que populações de células normais são normalmente capazes de passar por um número limitado de ciclos celulares antes de ter sua proliferação interrompida, um efeito que pode ser revertido pela ação da enzima telomerase. Pela ligação em *E-boxes* no promotor do gene que codifica uma subunidade-chave da telomerase humana, Myc pode aumentar a expressão dessa enzima em certos tipos de célula, permitindo-lhes passar por muitos outros ciclos de crescimento e divisão além do que normalmente lhes seria permitido.

Figura 8.29 Os poderes da oncoproteína Myc Os amplos efeitos da proteína Myc são ilustrados por um experimento no qual a proteína Myc foi fundida à proteína do receptor de estrogênio (ER) (azul). Na ausência dos ligantes de ER, como o estrogênio e o tamoxifeno, a proteína Myc-ER encontra-se presa no citoplasma (por meio da associação com proteínas de choque térmico, *não-mostrado*). Quando os ligantes do ER, estrogênio e tamoxifeno (*pequena esfera púrpura*), são adicionados às células, a proteína Myc-ER migra para o núcleo, associa-se a Max e ativa genes-alvo de Myc em minutos. Tal ativação, quando induzida em células privadas de soro na fase G_0 , permite a elas adentrar o ciclo ativo e avançar pela fase G_1 até a fase S.



Myc também age sobre vários outros genes-alvo que operam fora da maquinaria do ciclo celular (Figura 8.30A). Análises das células de *Drosophila*, bem como de mamíferos, indicam que Myc associa-se a 12 a 15% dos genes presentes nos genomas de cada um desses tipos de células. (Não está claro quantos desses genes são *regulados* por Myc, uma vez que, de acordo com estimativas, somente cerca de mil moléculas de Myc estão presentes em uma célula de mamífero normal.) No caso da *Drosophila*, a análise de alguns desses genes indica que Myc age amplamente dentro da célula para promover o crescimento celular no sentido estrito da palavra, ou seja, aumento do tamanho da célula. Isso pode ter efeitos também sobre as células de mamíferos: se uma célula humana encontra-se incapaz de prosseguir por todo o ciclo celular a menos que atinja um determinado tamanho dito mínimo, Myc pode facilitar a proliferação celular pela promoção de aumentos no tamanho celular. Tal efeito pode agir sinergisticamente com a habilidade de Myc, descrita anteriormente, de regular muitas das proteínas que governam a passagem da célula pelo ponto R. No contexto da patogênese do câncer, Myc parece ter ainda outros efeitos biológicos, notadamente por sua influência na tumorigênese por células-tronco embrionárias (ES) (Figura 8.30B).

8.10 O TGF- β impede a fosforilação de pRb e assim bloqueia a progressão do ciclo celular

O TGF- β representa um dos principais sinais de inibição do crescimento que células normais, especialmente epiteliais, devem aprender a evitar a fim de tornarem-se células cancerosas. Como será visto mais tarde, o TGF- β também exerce outros efeitos distintos sobre células, forçando-as a mudar seus programas de diferenciação. Com frequência, as modificações resultantes no fenótipo celular favorecem a progressão tumoral, pois algumas dessas alterações fenotípicas permitem às células tumorais tornarem-se independentes de ancoragem, angiogênicas e mesmo invasivas.

Esses dois principais efeitos do TGF- β – um antagonizando e o outro favorecendo a progressão tumoral – estão em conflito direto. Células cancerosas frequentemente resol-

Barra lateral 8.6 Muitas oncoproteínas funcionam com fatores de transcrição Myc é somente um de um grande grupo de fatores de transcrição que podem agir como oncoproteínas (Tabela 8.2). Inicialmente encontramos oncoproteínas desse tipo na nossa discussão sobre os genes *myc*, *fos* e *jun* (Seção 6.1), cada um dos quais codifica um fator de transcrição que pode funcionar como uma oncoproteína. Após, lemos sobre proteínas STAT (Seção 6.8), NF- κ B, Notch e Gli (Seção 6.12), que também podem assumir esses

duplos papéis. Esses vários fatores de transcrição agem em uma variedade de genes-alvo para induzir fenótipos que associamos a células transformadas.

A lista de genes-alvo que são influenciados por cada um desses fatores de transcrição permanece pouco definida. A falta de informação é explicada pelo fato de que, experimentalmente, tem sido muito difícil determinar as identidades dos promotores dos genes aos quais os fatores de transcrição de interesse se ligam. O recente desenvolvimento da técnica de precipita-

ção de cromatina (ChIP) promete resolver tal problema. No procedimento ChIP, a cromatina (contendo ambos, o DNA e proteínas associadas que foram quimicamente ligadas ao DNA) é mecanicamente cortada em pequenos fragmentos. Um anticorpo que reage com um fator de transcrição específico é então usado para imunoprecipitar aqueles poucos fragmentos de cromatina que têm o fator de transcrição de interesse associado. Moléculas de DNA são então extraídas do precipitado, e suas seqüências determinadas usando amplificação por PCR. As seqüências resultantes são então comparadas com as seqüências de todos os genes conhecidos presentes no genoma humano ou de camundongo, resultando na identificação de genes específicos cujos promotores estão ligados a esse fator de transcrição e podem, por conseguinte, ser ativados ou reprimidos por tal associação. A aplicação da técnica de ChIP a uma grande variedade de fatores de transcrição pode logo ajudar a revelar a identidade de grupos de genes que são alvos de indução ou repressão transcricional por esses fatores de transcrição oncogênicos.

Tabela 8.2 Representantes das classes de genes codificantes de TFs que agem como oncoproteínas^a

Fator de transcrição	Genes representantes
Zipper de leucina + domínio de ligação ao DNA básico	<i>fos</i> e <i>jun</i>
Hélice + alça + hélice (bHLH)	<i>myc</i> , <i>N-myc</i> , <i>L-myc</i> , <i>tal</i> e <i>sci</i>
Dedo de zinco	<i>myl/RARα</i> , <i>erbA</i> , <i>evi-1</i> e <i>gli-1</i>
Homeobox	<i>pbx</i> e <i>Hox2.4</i>
Outros	<i>myb</i> , <i>rel</i> , <i>ets-1</i> , <i>ets-2</i> , <i>fli-1</i> , <i>spi-1</i> , <i>ski</i>

^aOs genes estão agrupados de acordo com as características estruturais das proteínas codificadas.

Adaptada de T. Hunter, *Cell* 64:249-270, 1991

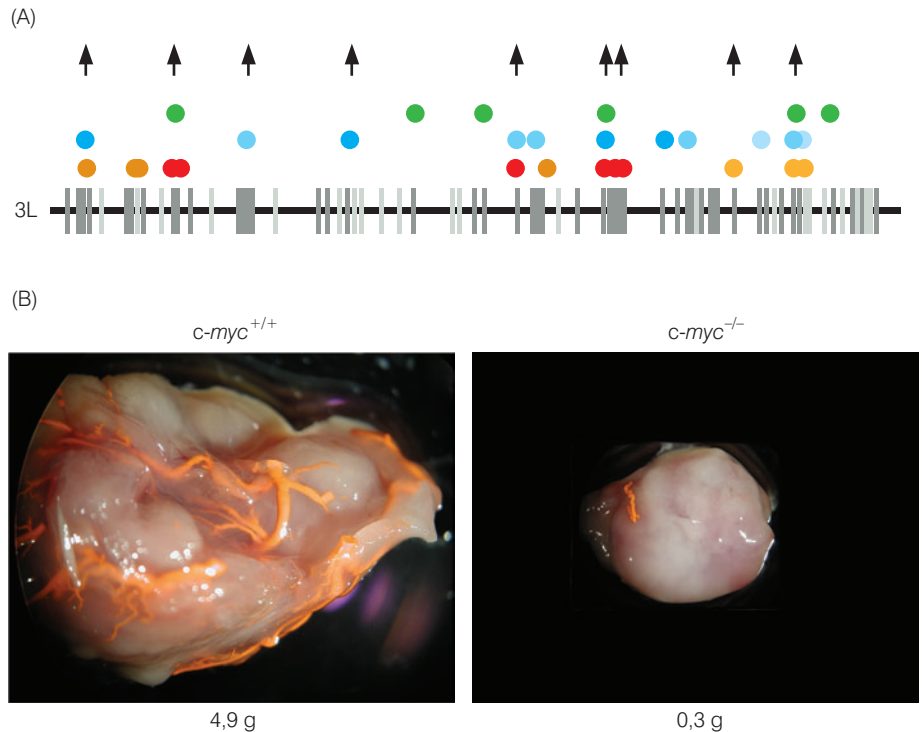
vem tal dilema ao aprender como evadir dos efeitos citotáticos do TGF- β ao mesmo tempo em que mantêm intactas outras respostas, principalmente aquelas favorecendo o poder de invasão das células tumorais. As ações citostáticas do TGF- β derivam de seus efeitos diretos e indiretos sobre pRb, o controlador central que determina se uma célula irá ou não proliferar.

Como mencionado anteriormente, o TGF- β tem seu próprio receptor que se vale de serina/treonina cinases (em vez de tirosina cinases) em seu domínio citoplasmático para emitir sinais. Os alvos primários desses sinais documentados até o momento são proteínas da família de fatores de transcrição Smad. Uma vez fosforiladas por um receptor de TGF- β , moléculas da proteína Smad2 (ou Smad3) se associam a proteínas Smad4 (que não constituem substratos para a fosforilação pelo receptor), e o complexo protéico heterodimérico resultante migra em direção ao núcleo, onde age como um fator de transcrição (veja a Figura 6.29D).

Como vimos antes, no contexto de controle do ciclo celular, os alvos mais importantes da ação por TGF- β são os genes que codificam os dois inibidores de CDK, p15^{INK4B} e, em menor proporção, p21^{Cip1} (veja a Figura 8.14A). Cada um deles tem uma seqüência CAGAC no seu promotor que atrai o complexo fator de transcrição heterodimérico Smad3-Smad4. Por si só, apenas, o complexo Smad não pode ativar a transcrição desses genes. O complexo colabora com outro fator de transcrição – o fator Miz-1, mencionado na seção anterior – que se liga adjacientemente às seqüências de DNA nos promotores desses dois genes para ativar sua transcrição (Figura 8.31, à esquerda).

Também notamos anteriormente que a oncoproteína Myc, agindo em direção oposta, pode bloquear a indução desses dois bloqueadores de CDK, fazendo-o por meio de sua habilidade de associar-se a Miz-1. Pela repressão da expressão de genes que codificam para p15^{INK4B} e p21^{Cip1}, Myc remove dois grandes obstáculos do seu caminho de modulação da progressão do ciclo celular (veja a Figura 8.28). Posto de outra maneira, os altos

Figura 8.30 As amplas ações de Myc Myc age de maneiras diversas sobre as células, além dos efeitos sobre o ciclo celular. (A) Um estudo sistemático de genes-alvo regulados por Myc, Max e fatores de transcrição Mnt relacionaods à Mad nas células de *Drosophila melanogaster* indicaram que eles estão presentes em grandes números e estão distribuídos pelo genoma da *Drosophila* em seus quatro cromossomos. Embora todo o cromossomos tenha sido rastreado para sítios de ligação de Myc, somente o braço longo do cromossomo 3 (i. e., 3L) é mostrado aqui. Esse estudo analisou a habilidade da Myc da *Drosophila* (círculos verdes), da Mnt semelhante a Mad (círculos vermelhos) e da Max (círculos azuis) de associarem-se a segmentos de DNA cromossomais específicos. Em conjunto, esse estudo indicou que cerca de dois mil promotores de genes da *Drosophila* estão associados a uma ou mais dessas proteínas bHLH; a maioria desses promotores estão afiliados com genes que podem ter sua expressão aumentada ou diminuída por pares desses fatores de transcrição bHLH. Vários genes que são ortólogos de genes de mamíferos e alvos conhecidos da ação de Myc em células de mamíferos estão indicados com setas pretas. (B) Outras evidências de ações pleiotrópicas de Myc vêm de experimentos biológicos, como esse, no qual a tumorigenicidade de células-tronco embrionárias (ES) de camundongo foi medida. Células ES do tipo selvagem (à esquerda, *c-myc*^{+/+}) de grandes tumores altamente vascularizados (veias alaranjadas), enquanto células privadas da função de Myc (à direita, *c-myc*^{-/-}) falham bastante em crescer, em grande parte por uma falha em desenvolver um suprimento vascular adequado; as duas populações de células têm o mesmo índice de crescimento *in vitro*. (A, adaptada de A. Orian et al., *Genes Dev.* 17:1101-1114, 2003; B, de T.A. Baudino et al., *Genes Dev.* 19:2530-2543, 2002.)



níveis constitutivamente expressados pela proteína Myc produzida por oncogenes *myc* asseguram que a expressão desses dois inibidores de CDK seja fortemente reprimida, permitindo avanço do ciclo celular.

Em células normais, TGF- β precisa ter a última palavra em determinar se as células proliferam ou não. Para tanto, o TGF- β precisa sobrepor quaisquer sinais conflitantes que Myc possa liberar. Para que isso ocorra, o TGF- β deve assegurar-se de que Myc não ativar seu esquema de expressão dos inibidores p15^{INK4B} e p21^{Cip1}. Assim, em células normais, TGF- β mantém Myc afastado dos promotores desses genes por meio da supressão da expressão do proto-oncogene *myc* (Figura 8.31, à direita). O promotor do gene *myc* possui uma sequência à qual o fator de transcrição Smad3 ativado pelo TGF- β pode ligar-se. Adjacente a essa sequência, existe outra, que permite a ligação de E2F4 ou E2F5, os dois fatores de transcrição que favorecem a repressão transcrricional (Seção 8.7). Pela formação de um complexo de três partes com E2F4/5 mais p107, a Smad3 assegura o desligamento da transcrição de *myc*, eliminando assim os efeitos promotores de crescimento da proteína Myc do circuito regulador das células. Uma vez que TGF- β teve sucesso na remoção de Myc da cena – a partir dos promotores dos inibidores CDK p15^{INK4B} e p21^{Cip1} –, TGF- β pode então usar os complexos Smad3-Smad4 em conjunto com Miz-1 para ativar esses dois promotores, induzindo assim a expressão desses inibidores de CDK criticamente importantes (Figura 8.31, à esquerda).

Muitos tipos de células cancerosas precisam evadir a inibição de crescimento imposta por TGF- β . Mais especificamente, essas células cancerosas dependem de altos níveis do fator de transcrição Myc para regular sua proliferação e, portanto, devem liberar a transcrição de *myc* das ações repressoras de TGF- β . Isso explica por que, por exemplo, em uma série de 12 carcinomas de mama humanos, a expressão de *myc* não respondia mais à ação supressiva do TGF- β , mesmo as respostas ao TGF- β estando intactas em 11 desses tumores. (Uma vez que o próprio gene *myc* parecia estar em uma configuração tipo selvagem nesses tumores, isso sugeriu alguma falha na regulação dos fatores de transcrição responsáveis pela expressão desse gene.) Da mesma forma, quando oncogenes *myc* são originados por mutação, eles adquirem promotores constitutivamente ativados que não mais respondem à repressão induzida pelo TGF- β . Uma vez protegido da repressão, o oncogene *myc*, ou melhor, seu produto Myc

mantém a expressão dos dois inibidores de CDK (i. e., p15^{INK4B} e p21^{Cip1}) em níveis muito baixos por tempo indeterminado. Como notado anteriormente, isso ajuda a criar uma condição na célula que permite rápida proliferação.

Em um sentido mais geral, células cancerosas seletivamente escapam das influências supressivas do crescimento exercidas pelo TGF- β , mas mantêm-se sensíveis a outros efeitos potencialmente úteis ao seu estabelecimento. Com frequência, a evasão dos efeitos supressivos do TGF- β ocorre pela inativação da rota de sinalização da pRb. Com efeito, em células normais, a pRb opera como um freio que pára a proliferação em resposta a sinais iniciados por TGF- β . Similarmente, se a proteína pRb é eliminada do circuito regulador por meio de um dos vários mecanismos descritos anteriormente, então a habilidade de TGF- β de impor a supressão do crescimento é comprometida, pois p15^{INK4B} por ele induzida agora falha em bloquear o avanço pelo ciclo celular.

Uma inativação parcial das respostas de TGF- β também pode ser obtida, por exemplo, por meio de mutações do gene que codifica a proteína Smad2; tais mutações são freqüentemente observadas em carcinomas de cólon. Um efeito similar do bloqueio das propriedades anti-mitogênicas de TGF- β parece ser obtido pela oncoproteína Ski (Tabela 3.3). Juntamente

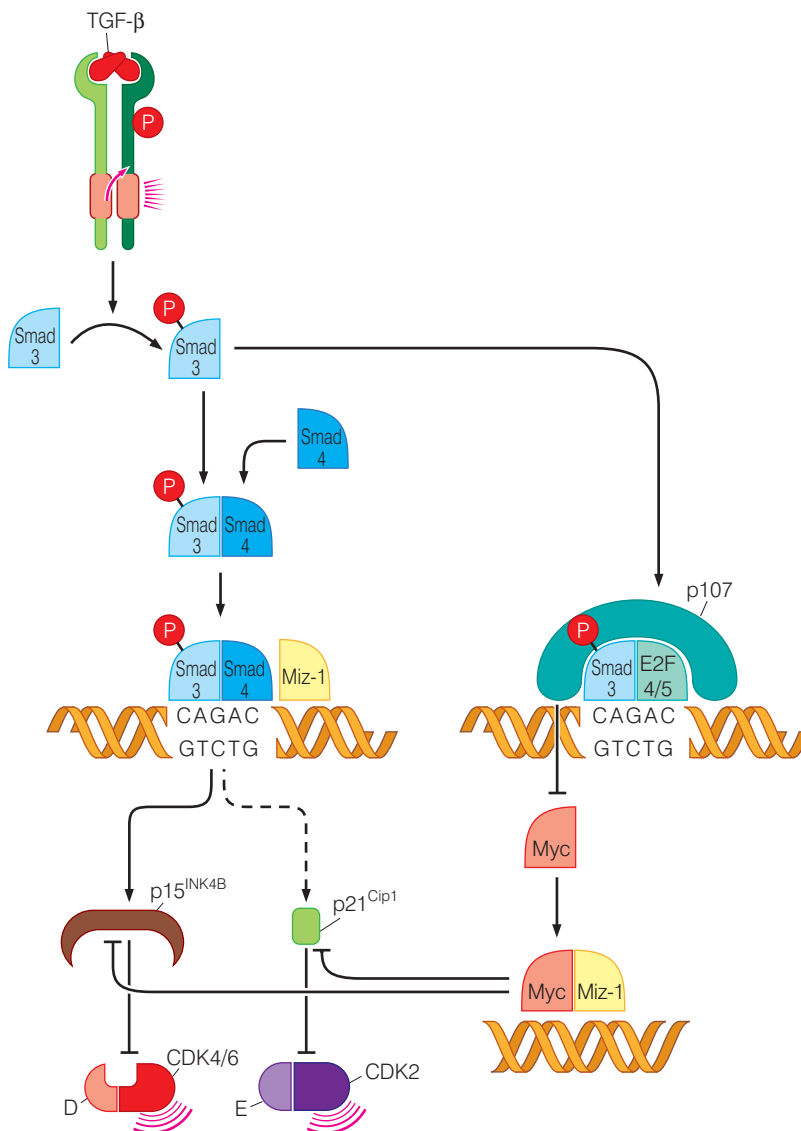


Figura 8.31 As ações de contrabalanço de TGF- β e Myc. O TGF- β , agindo por meio de seu receptor, causa a fosforilação de várias proteínas Smad, como a Smad3 aqui mostrada (à esquerda, acima). (Smad2, não-mostrada, age de forma equivalente à Smad3). A Smad3 então forma um complexo heterodimérico com a Smad4, que migra para o núcleo, onde colabora com Miz-1 para induzir a expressão dos bloqueadores de CDK p15^{INK4A} (fracamente) e p21^{Cip1}. Myc, por sua parte, é capaz de colaborar com Miz-1 para reprimir a expressão desses inibidores de CDK (abaixo, à direita). Entretanto, esta ação da Myc pode ser bloqueada pelo TGF- β , que despacha a Smad3 para formar um complexo com E2F4 ou E2F5 juntamente da p107 (proteína-prima da pRb, à direita) que reprime a expressão do gene *myc*, levando a um colapso dos níveis de Myc. Isso faz com que o TGF- β tenha sucesso em induzir a expressão dos dois inibidores de CDK—p15^{INK4A} e p21^{Cip1}—e, com isso, bloqueie a progressão pelo ciclo celular no início/metade da fase G₁.

com sua prima, a proteína Sno, Ski é capaz de ligar-se ao complexo de fator de transcrição Smad3-Smad4 e bloquear sua capacidade de reprimir a transcrição de *myc*.

A metade de todos os carcinomas pancreáticos e mais de um quarto de todos os cânceres de cólon são portadores de proteínas Smad4 mutantes não-ativas. Sem a presença de Smad4, não há formação de complexos Smad2-Smad4 nem Smad3-Smad4. Esses dois complexos são componentes fundamentais enviados pelo receptor do TGF- β ao núcleo com a importante tarefa de interromper a proliferação.

Alguns tipos de células cancerosas lançam mão de uma manobra evasiva ainda mais drástica para evitar a ação supressiva do TGF- β : eles inativam os genes que codificam para o receptor TGF- β . Por exemplo, a maioria dos cânceres de cólon que apresentam “instabilidade de microssatélites” (um estado que leva a altos graus de mutação; veja a Seção 12.9), é portadora de receptores TGF- β II mutantes inativos. Enquanto tais células adquirirem a habilidade de evadir da inibição de crescimento imposta por TGF- β , elas beneficiam-se dos potenciais efeitos gerados nos estágios tardios de progressão tumoral quando o TGF- β as auxilia a adquirir fenótipos malignos como invasibilidade.

8.11 A função da pRb e os controles da diferenciação estão intimamente ligados

A diferenciação celular é um processo de importância crucial na patogênese do câncer e, como tal, é repetidamente mencionada neste texto. Até o momento, podemos imaginar que, ainda que de maneira simples, as células do corpo podem existir em um de dois estados de crescimento alternativos. Elas podem ser encontradas em um estado relativamente não-diferenciado, no qual retêm a opção de se dividir caso sinais mitogênicos sejam gerados; esse é essencialmente o comportamento de células-tronco. A alternativa é que as células podem abandonar esse estado e entrar em outro, mais diferenciado, no qual não mais proliferarão e, portanto, tornam-se pós-mitóticas. Os fatores que governam essas alterações consideradas fundamentais na biologia da célula podem ser explicados pelos controles moleculares que determinam se uma célula permanecerá no processo ativo de crescimento e divisão, se manterá na fase reversível G_0 ou sairá irreversivelmente desse ciclo, progredindo para um estado pós-mitótico, diferenciado.

A oposição entre proliferação e diferenciação é vista mais claramente na formação da maioria dos tipos de células cancerosas, na qual a diferenciação é parcial ou totalmente bloqueada (veja, p. ex., a Barra lateral 8.7). Cientes disso, poderíamos perguntar se duas alterações independentes nos circuitos de controle da célula devem tomar parte durante a formação de uma célula cancerosa – uma que descontrola a proliferação e outra que bloqueia a diferenciação. A alternativa é mais simples: poderiam, certas alterações, de uma só vez, desregular a proliferação e impedir a diferenciação?

Evidências atestando essa idéia, que implicam o acoplamento entre os mecanismos que controlam ambos os processos citados, têm vindo de estudos sobre a diferenciação de células musculares *in vitro*. Nesse sistema experimental, **mioblastos** relativamente indiferenciados podem ser induzidos a sofrer diferenciação em **miócitos** (células musculares). O bloqueio dessas células na fase G_1 do ciclo celular do mioblasto, obtido experimentalmente por meio da introdução e superexpressão de genes que codificam para os inibidores de CDK p16^{INK4A} ou p21^{Cip1}, faz com que os mioblastos diferenciem-se mesmo sob condições em que isso não ocorreria normalmente (p. ex., altos níveis de fatores de crescimento no meio) (Figura 8.33). Mioblastos de camundongo geneticamente alterados que não têm ambas as cópias do gene *Rb* e que, por conseguinte, não expressam pRb, não respondem às influências da diferenciação induzida ocasionada pela introdução dos genes que codificam para p16^{INK4A} e p21^{Cip1}. Além disso, a superexpressão da ciclina D1 em mioblastos (que causa fosforilação e inativação da pRb) bloqueia a diferenciação que é normalmente observada quando fatores de crescimento são removidos do seu meio de cultura. Esses experimentos indicam que pRb hiper-

fosforilada é necessária para duas funções estanques – a interrupção da proliferação dos mioblastos e a facilitação da diferenciação dessas células em miócitos.

Outras conexões moleculares entre o controle do ciclo celular e a diferenciação têm sido descobertas. Assim, a indução da expressão de inibidores CDK, como p21^{Cip1} ou p27^{Kip1}, é capaz de promover a diferenciação de células de neuroblastoma e células da leucemia mielomonocíticas, enquanto a expressão reforçada de E2F4 (uma forma repressiva de E2F; Seção 8.7) induz a diferenciação de células neuronais precursoras. Camundongos geneticamente desprovidos desse fator de transcrição (e, assim, com um genótipo *E2f4*^{-/-}) não sobrevivem ao período de gestação devido ao defeito de diferenciação em seus eritrócitos. O fator de transcrição C/EBP, que induz à diferenciação de adipócitos (células de gordura), associa-se a E2Fs, e um fator de transcrição específico para osteoblastos (CBFA1) liga-se à pRb. Finalmente, o ácido retinóico induz a diferenciação de células da leucemia pró-mielocítica aguda (APL), em parte por sua habilidade de acionar a degradação da ciclina D1.

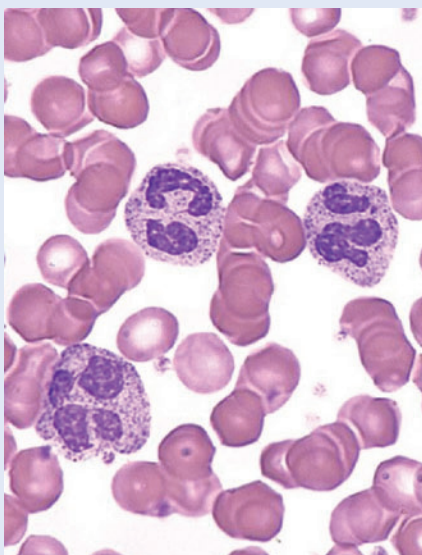
Essas observações experimentais diversas indicam que a maquinaria responsável pelo controle do estado de fosforilação da pRb e de suas proteínas-primas é também uma ativa participante

Barra lateral 8.7 O bloqueio da diferenciação pode acompanhar o avanço da progressão tumoral Algumas malignidades hematopoiéticas, mais especificamente as leucemias, vêm em duas formas – crônica e aguda. As doenças crônicas, como a leucemia mielogênica crônica (CML) são compostas por células mais maduras e diferenciadas e podem continuar por anos sem tornarem-se uma ameaça à vida (Figura 8.32). No caso da CML, após um período de 3 a 5 anos, ocorre repentinamente a emergência de uma forma mais maligna e agressiva da doença, chamada “crise blástica”. As células presentes na crise blástica originam-se claramente do mesmo clone celular que iniciou a fase crônica da doença. Entretanto, elas são menos diferenciadas e multiplicam-se sem cessar, criando uma doença que é difícil de tratar e que constitui uma

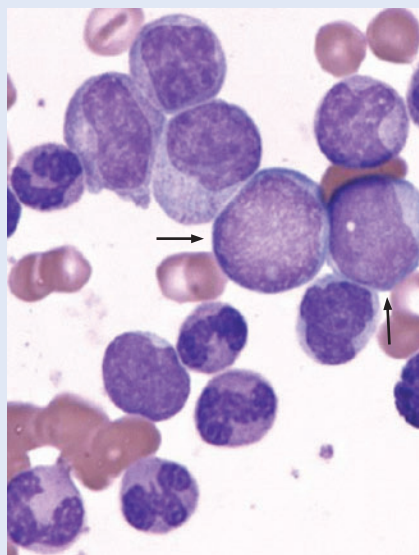
ameaça à vida do paciente. Parece que as células na fase crônica são derivadas de uma célula tronco mutante auto-renovante, mas essa doença permanece relativamente benigna porque a diferenciação dessas células mutantes em neutrófilos pós-mitóticos procede normalmente. No momento em que tal diferenciação é bloqueada (por

alterações genéticas ainda desconhecidas), células nessa população ficam presas em um compartimento de células-tronco menos diferenciadas (do tipo eritróide ou mielóide) e proliferam sem uma saída compensatória de sua progênie em direção a um compartimento pós-mitótico mais diferenciado.

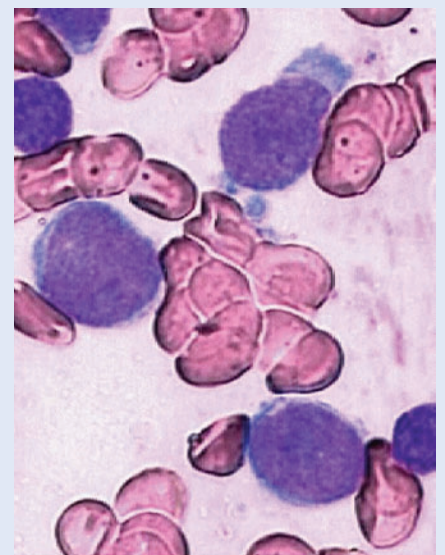
Figura 8.32 Progressão da doença e de-diferenciação (A) A leucemia mielogênica crônica (CML) leva à acumulação no sangue de elevados números de células quase totalmente diferenciadas em neutrófilos (células púrpura, núcleo complexo). As células em cor rosa são eritrócitos. (B) Após vários anos, quando a fase crônica da doença progride para uma fase “acelerada”, esses neutrófilos mais diferenciados são substituídos por células blásticas menos diferenciadas (setas). (C) Por fim, esta fase acelerada progride para uma “crise blástica”, quando o sangue periférico carrega grandes números de células não-diferenciadas. Esta última fase parece refletir o comportamento das células-tronco leucêmicas que já estavam presentes na fase crônica da doença, mas que agora são impedidas de diferenciar-se. (A e B, cortesia de P.G. Maslak; C, cortesia do Banco de Imagens da Sociedade Americana de Hematologia.)



(A) fase crônica

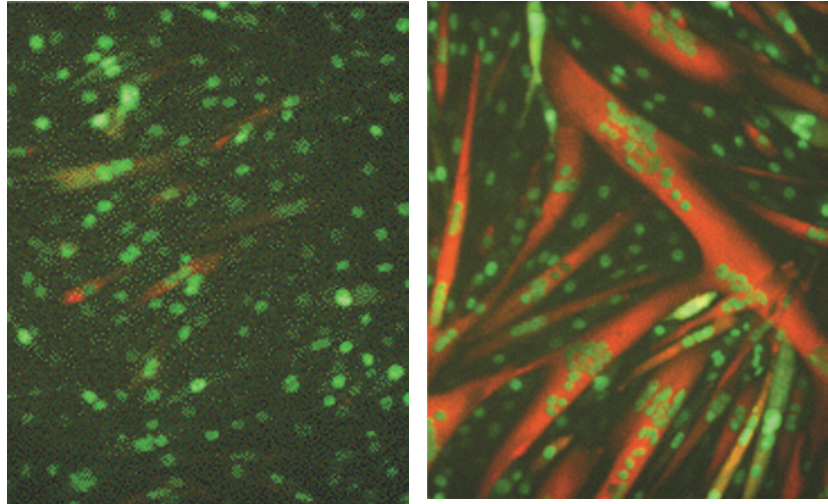


(B) fase acelerada



(C) crise blástica

Figura 8.33 Diferenciação de mioblastos em miócitos Os mioblastos, precursores menos diferenciados das células musculares (miócitos) podem ser cultivados *in vitro* e permanecer no estado indiferenciado (*painel à esquerda*). Entretanto, vários tipos de sinais fisiológicos podem induzi-los a diferenciar-se em miócitos *in vitro*, em que estes se fundem para formar fibras musculares (*vermelho, painel à direita*). Por exemplo, a remoção do soro (e seus fatores de crescimento associados) do meio de cultura leva à diferenciação. Vários experimentos demonstraram que a diferenciação pode ser impedida pela fosforilação forçada de pRb e sua conseqüente inativação. Contrariamente, sinais que impedem a fosforilação da pRb favorecem e freqüentemente induzem diferenciação. (De E.M. Wilson et al., *Mol. Biol. Cell* 15:497-505, 2003.)



nos processos de diferenciação descritos anteriormente. Mais especificamente, sinais que favorecem a hiperfosforilação (e, em conseqüência, a inativação funcional) das três proteínas tipo *pocket* (pRb, p107 e p130) operam para bloquear a diferenciação, enquanto aquelas que previnem a hiperfosforilação de pRb favorecem a diferenciação. Essa conexão, ainda pouco documentada para a maioria dos tipos celulares, sugere outro fato que permanece ainda pura especulação: quando uma célula decide deixar o ciclo celular ativo a fim de diferenciar-se, ela sai do ciclo em algum momento durante a fase G_1 , quando pRb ainda está ativa no controle do destino da célula.

Uma outra linha de evidência indicando uma relação entre a diferenciação e a maquinaria do ciclo celular vem de pesquisas com a proteína Myc. Como mencionado anteriormente (Seção 8.9), a proteína Myc altera o equilíbrio entre proliferação e diferenciação pós-mitótica em favor da primeira. A fim de compreender essas ações, precisamos levar em conta que muitos dos fatores de transcrição que controlam os programas de diferenciação são, tal qual Myc, membros da família bHLH de fatores de transcrição. Entretanto, essas proteínas bHLH funcionam muito diferentemente de Myc: elas coordenam complexos programas de diferenciação que variam de tecido para tecido, enquanto Myc atua em direção oposta bloqueando a diferenciação e promovendo a proliferação. Fatores de transcrição da família bHLH associados à diferenciação têm sido mais intensamente estudados no desenvolvimento embrionário de várias linhagens distintas de células, incluindo aquelas que levam à formação dos músculos, sistema nervoso, pâncreas e sistema imune. Por exemplo, quatro bHLH distintas – chamadas MyoD, Myf5, miogenina e MRF4 – operam na diferenciação de mioblastos em miócitos (Figura 8.33) por meio do controle de várias fases do programa de diferenciação específico para o tecido muscular.

Myc aumenta a produção da proteína Id2, e esta age como um antagonista dos fatores de transcrição bHLH que programam a diferenciação. Id2 é uma de um grupo de proteínas que se inter-relacionam (Id1 a Id4) que também são membros da família bHLH dos fatores de transcrição. As proteínas Id operam, entretanto, como inibidores dominantes negativos de outros fatores de transcrição bHLH (Figura 8.34). Mais especificamente, as Ids podem formar heterodímeros com fatores de transcrição bHLH, mas não se ligam ao DNA (porque elas não possuem o domínio envolvido no reconhecimento de DNA). Isso explica como proteínas Id, como a Id2, podem agir como inibidores dos fatores de transcrição indutores de diferenciação bHLH e, com isso, impedir a diferenciação.

As proteínas Id estão presentes em altos níveis em vários tipos de células em crescimento ativo, e isso, por si, reduz a possibilidade de que essas células vão diferenciar-se. Assim, por meio da associação com MyoD, uma proteína Id pode evitar que a MyoD programe a dife-

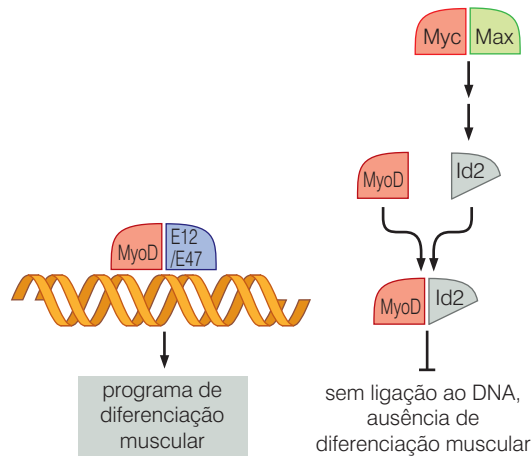


Figura 8.34 Os fatores de transcrição Id e a inibição da diferenciação. Fatores de transcrição bHLH específicos para linhagens, tais como MyoD, mostrado aqui, (rosa) formam heterodímeros com parceiros amplamente expressos E12 ou E47 (púrpura). Os fatores de transcrição heterodiméricos resultantes orquestram os programas de diferenciação em vários tecidos, incluindo a diferenciação muscular indicada aqui (à esquerda). A formação destes complexos de fatores de transcrição heterodiméricos pode, entretanto, ser bloqueada por proteínas Id (cinza-claro), que formam heterodímeros com proteínas bHLH específicas para linhagens, assim evitando a associação desta última com E12 ou E47. Como as proteínas Id não têm um domínio de ligação ao DNA, elas agem como inibidores “dominantes negativos” naturais da expressão de proteínas bHLH específicas para linhagens. A expressão de certas proteínas Id, como a Id2, mostrada aqui, pode ser induzida por Myc (agindo com sua parceira Max; acima, à direita); isso ajuda a explicar a habilidade observada na oncoproteína Myc de bloquear a diferenciação de várias células.

renciação muscular em mioblastos que estejam em crescimento ativo. Durante o curso normal da diferenciação, entretanto, os níveis de proteínas Id diminuem a níveis não detectáveis, e MyoD, agora livre da interferência das Ids, torna-se capaz de dimerizar-se com seus parceiros bHLH (chamados E12 e E47) a fim de ativar os programas de diferenciação específicos para o tecido muscular (veja a Figura 8.34). Sabe-se que a redução na síntese da proteína Id1 é necessária para a saída do ciclo celular e a diferenciação em várias linhagens de células: musculares, pancreáticas, células epiteliais mamárias, células mielóides, células eritróides, células miocárdiais, células B e T e osteoblastos.

Como se pode esperar do que foi exposto, as proteínas Id também têm sido associadas à patogênese do câncer. Em vários tipos de células normais, as moléculas de Id2 ligam-se e são seqüestradas pelas moléculas de pRb, mais abundantes. Entretanto, em neuroblastomas, um tumor pediátrico relativamente comum, Id2 é freqüentemente superexpressada, porque sua expressão é dirigida por cópias extras da proteína N-Myc, uma prima de *myc* que age sobre os mesmos alvos de *myc* nas células (Seção 4.5). Agora as “mesas são viradas”: em células de neuroblastoma, a Id2 acumula a níveis tão elevados que chegam a excessos molares da ordem de 10× em relação à pRb. Conseqüentemente, a pRb não mais é capaz de seqüestrar e regular as proteínas Id2 dessas células. Com isso, elas estão livres para bloquear as ações dos fatores de transcrição indutores de diferenciação bHLH.

O tema do antagonismo mútuo entre componentes promotores de crescimento do relógio do ciclo celular e a maquinaria do processo de diferenciação é ilustrado por outras conexões cruzadas entre esses dois mecanismos de regulação. Por exemplo, durante a proliferação ativa, as ciclinas E-CDK2 e A-CDC2 fosforilam a MyoD nos mioblastos, com isso promovendo sua degradação e conseqüentemente eliminando seus efeitos indutores de diferenciação. Evidências de outras conexões cruzadas continuam a ser descobertas. Dados de uma pesquisa indicam que a ciclina D1 associa-se a e inibe um fator de transcrição que é responsável pela expressão de proteínas associadas à diferenciação de células epiteliais do duodeno.

Antagonismo operando em direções opostas é exibido por componentes-chave da maquinaria de diferenciação. Assim, a proteína MyoD, que é tão importante na programação da diferenciação muscular, age sobre o ciclo celular e inibe a proliferação, causando aumento na produção de pRb e do inibidor de CDK p21^{Cip1}. MyoD também parece ligar-se diretamente à CDK4, inibindo sua atividade.

Anteriormente vimos que, quando uma célula recebe sinais que a encorajam a diferenciar-se, a parceira de Myc, Max, é seqüestrada por Mad, e os níveis desta última aumentam progressivamente durante a diferenciação (veja a Figura 8.27). Isso cria uma condição que permite a interrupção do ciclo celular e a diferenciação. Assim, os complexos Mad-Max causam aumento na expressão das duas proteínas-primas de pRb, p107 e p130. Nesse meio tempo,

Myc, desprovida de ajuda de sua companheira Max, torna-se isolada do circuito molecular que governa o destino da célula e assim perde sua habilidade de bloquear a diferenciação.

Uma demonstração dramática da oposição entre a oncoproteína Myc e a diferenciação celular vem de um modelo de patogênese de câncer hepático em camundongos que depende da expressão dirigida de um transgene *myc* em hepatócitos. Grandes carcinomas hepatocelulares formam-se e regredem quando o transgene *myc* é desativado. Ao mesmo tempo, muitas das células do carcinoma, que anteriormente não assumiam características de hepatócitos normais, rapidamente diferenciam-se em células hepáticas que detêm características histológicas de aparência normal.

Esses vários controles da diferenciação celular envolvendo pRb, Myc, Ids e outras proteínas reguladoras têm claras implicações na patogênese do câncer, uma vez que tumores formados por células mais diferenciadas são menos agressivos, enquanto aqueles compostos por células pouco diferenciadas tendem a ser muito mais agressivos e de pior prognóstico para o paciente.

8.12 O controle da função de pRb é perturbado na maioria, se não em todos, dos tipos de cânceres humanos

A falta de regulação da rota da pRb leva a um desfecho que é parte integrante do fenótipo de uma célula cancerosa – proliferação irrestrita. Isso explica por que a regulação normal da transição pelo ponto R, como parte da fosforilação de pRb, é provavelmente rompida na maioria, se não em todos, dos tipos de células tumorais (Tabelas 8.3 e 8.4). Esses mecanismos são sumarizados na

Tabela 8.3 Alterações moleculares em cânceres humanos levando à desregulação do relógio do ciclo celular

Alteração específica	Resultado clínico
Alterações da pRb	
Inativação do gene <i>Rb</i> por mutação	retinoblastoma, osteossarcoma, carcinoma pulmonar de células pequenas
Metilação do promotor do gene <i>Rb</i>	tumores cerebrais, outros diversos
Seqüestro de pRb por Id1, Id2	carcinomas diversos, neuroblastoma, melanoma
Seqüestro de pRb pela oncoproteína viral HPV E7	carcinoma cervical
Alteração nas ciclinas	
Superexpressão da ciclina D1 pela amplificação do gene da <i>ciclina D1</i>	carcinoma de mama, leucemias
Superexpressão da ciclina D1 causada por hiperatividade do promotor do gene da <i>ciclina D1</i> desencadeada por rotas mitogênicas <i>upstream</i>	diversos tumores
Superexpressão da ciclina D1 devido à degradação reduzida da ciclina D1 devido a atividade reprimida de GSK-3 β	diversos tumores
Superexpressão da ciclina D3 causada por hiperatividade do gene da <i>ciclina D3</i>	malignidades hematopoiéticas
Superexpressão da ciclina E	carcinoma de mama
Degradação defeituosa da proteína ciclina E devido à perda de hCDC4	carcinomas de endométrio, mama e ovário
Alteração das cinases dependentes de ciclinas	
Mutação estrutural de CDK4	melanoma
Alterações dos inibidores de CDK	
Deleção do gene da <i>15^{INK4B}</i>	tumores diversos
Deleção do gene da <i>16^{INK4A}</i>	tumores diversos
Metilação do promotor do gene <i>p16^{INK4A}</i>	melanoma, tumores diversos
Transcrição diminuída do gene <i>p27^{Kip1}</i> devido à ação da Akt/PKB no fator de transcrição Forkhead	tumores diversos
Degradação aumentada da <i>p27^{Kip1}</i> devido à superexpressão da Skp2	carcinomas de mama, colorretal e pulmão e linfomas
Localização citoplasmática da <i>p27^{Kip1}</i> devido à ação da Akt/PKB	carcinomas de mama, esôfago, cólon, tireóide
Localização citoplasmática da <i>p21^{Cip1}</i> devido à ação da Akt/PKB	tumores diversos
Alterações múltiplas concomitantes por Myc, N-myc ou L-myc	
Expressão aumentada de Id1, Id2 levando ao seqüestro de pRb	tumores diversos
Expressão aumentada da ciclina D2 levando à fosforilação da pRb	tumores diversos
Expressão aumentada de E2F1, E2F2 e E2F3 levando à expressão da ciclina E	tumores diversos
Expressão aumentada da CDK4 levando à fosforilação da pRb	tumores diversos
Expressão aumentada da Cul1 levando à degradação da <i>p27^{Kip1}</i>	tumores diversos
Repressão da expressão da <i>p15^{INK4B}</i> e da <i>p21^{Cip1}</i> permitindo a fosforilação da pRb	tumores diversos

Tabela 8.4 Alteração do relógio do ciclo celular em tumores humanos Um mais (+) indica que este gene ou produto está alterado em pelo menos 10% dos tumores analisados. A alteração de um produto de gene pode incluir ausência anormal ou superexpressão. A alteração do gene pode incluir mutação e metilação do promotor. Mais de uma das alterações indicadas pode ser encontrada num determinado tumor.

Tipo de Tumor	Rb	Ciclina E 1	Produto do gene ou gene Ciclina D1	P16 ^{INK4A}	P27 ^{Kip1}	CDK4/6	% de tumores com 1 ou mais alterações
Glioblastoma	+	+		+	+	+/+	> 80
Carcinoma de mama	+	+	+	+	+	+/	> 80
Carcinoma de pulmão	+	+	+	+	+	+/	> 90
Carcinoma pancreático			^a	+	+		> 80
Carcinoma gastrintestinal	+	+	^b	+	+	+/e	> 80
Carcinoma endometrial	+	+	+	+	+	+/	> 80
Carcinoma de bexiga	+	+	+	+	+		> 70
Leucemia	+	+	+	^c	+	+/	> 90
Cabeça e pescoço	+	+	+	+	+	+/	> 90
Linfoma	+	+	^d	^c	+	/+	> 90
Melanoma		+	+	+	+	+/	> 20
Hepatoma	+	+	+	^c	+	+/e	> 90
Carcinoma de próstata	+	+	+	+	+		> 70
Testículos/ovário	+	+	^b	+	+	+/	> 90
Osteossarcoma		+		+		+/	> 80
Outros sarcomas		+	+	+	+	/+	> 90

^aCiclina D3 está sobre-regulada em alguns tumores.

^bCiclina D2 está sobre-regulada em alguns tumores.

^cp15^{INK4B} também ausente em alguns tumores.

^dCiclina D2 e D3 também sobre-reguladas em alguns linfomas.

^eCDK2 também sobre-regulada em alguns tumores.

Adaptada de M.Malumbres e M. Barbacid, *Nat. Rev. Cancer* 1:222-231, 2001.

Figura 8.35. Estamos familiarizados com o mecanismo mais direto relacionado à falta de regulação do avanço pelo ponto R – a inativação do gene *Rb* por meio de mutação. Em alguns tumores, um desfecho equivalente é obtido por meio da metilação do promotor do gene *Rb*. Em outros, a pRb, embora sintetizada em quantidades normais, pode ser funcionalmente inativada por proteínas virais, como a proteína HPV E7, que impede a pRb de ligar-se e regular as E2Fs.

Uma outra estratégia usada por células cancerosas para inativar a função da pRb é indicada pela presença de níveis muito elevados de ciclina D1 em várias células tumorais humanas. Isso tem sido mais frequentemente documentado em células de câncer de mama, nos quais a metade dos tumores tem mostrado níveis elevados dessas proteínas. Nesses e em outros carcinomas, a superexpressão é algumas vezes obtida por aumentos no número de cópias dos

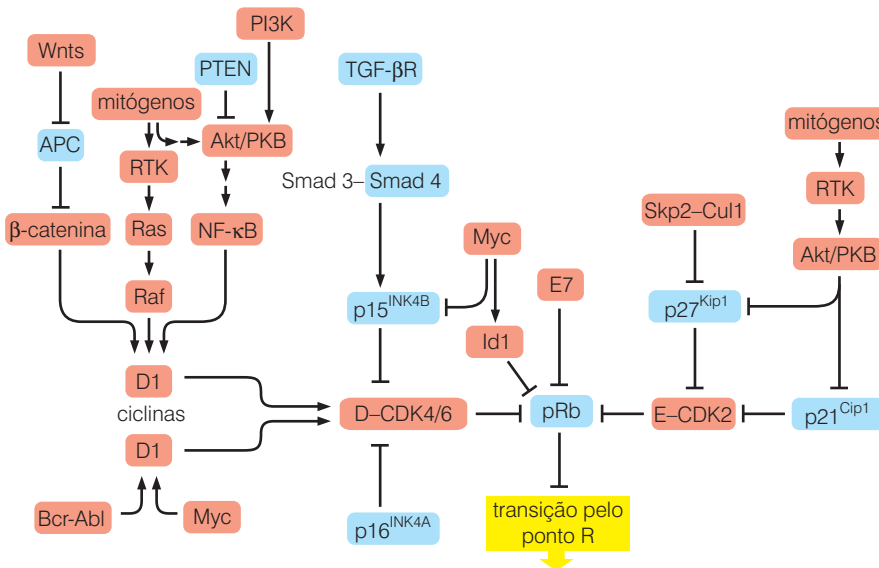


Figura 8.35 A perturbação da transição pelo ponto R em tumores humanos A decisão de avançar através da transição do ponto R (em amarelo, abaixo, no centro) pode ser perturbada de várias maneiras em tumores humanos. Elementos que favorecem o avanço pelo ponto R estão em vermelho, enquanto aqueles que atuam bloqueando este avanço são mostrados em azul. Quase todos os tumores humanos mostram uma hiperatividade de um ou mais dos agentes favorecendo esse avanço (vermelho) ou uma inativação dos agentes bloqueando esse avanço (azul).

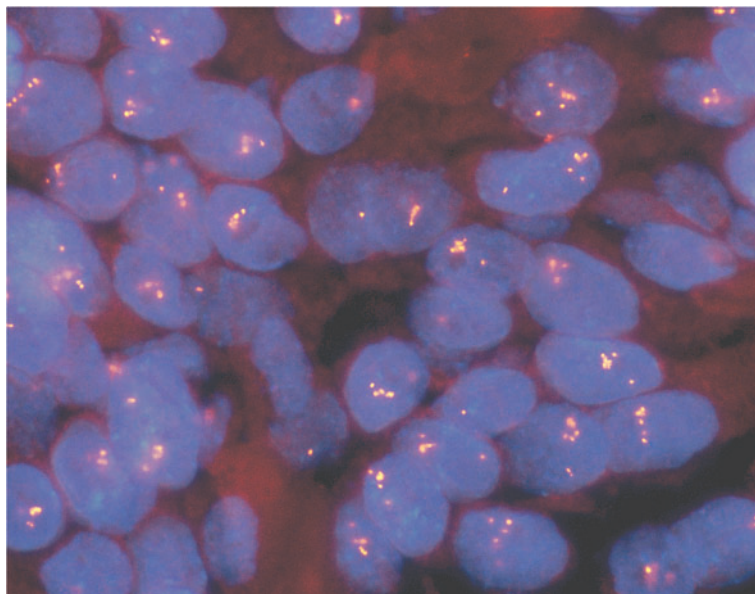
genes da ciclina D1 (i. e., amplificação do gene; Figura 8.36). Mais freqüentemente, entretanto, células de câncer de mama adquirem níveis elevados de ciclina D1 pela alteração de rotas de sinalização localizadas *upstream* (Seção 8.8) que são normalmente responsáveis pelo controle da expressão do gene da ciclina D1.

Uma tática alternativa é freqüentemente explorada por células cancerosas para desabilitar a maquinaria de pRb: elas interrompem a expressão das suas proteínas supressoras de tumores p16^{INK4A}. Lembre-se que a proteína p16^{INK4A}, tal qual sua prima, a proteína p15^{INK4A}, inibe a ciclina D-CDK4/6 responsável pela iniciação da fosforilação de pRb. Na ausência da proteína p16^{INK4A}, a fosforilação de pRb ocorre sem um mecanismo de parada resultando em excessiva atividade de cinase da ciclina D-CDK4/6, desregulação da fosforilação e inativação imprópria de pRb (veja a Figura 8.35). Indivíduos que sofrem de uma das formas de melanoma familiar herdam versões defeituosas do gene da p16^{INK4A}. Não está claro por que a perda desse inibidor de CDK em particular, que parece operar em todos os tipos de células do corpo, afeta especificamente melanócitos da pele, que consistem nos precursores normais das células do melanoma. Em tumores esporádicos (i. e., não-familiares), células cancerosas optam mais freqüentemente por outra estratégia para perder a função de p16^{INK4A} – elas metilam seqüências CpG presentes no promotor do gene p16^{INK4A}.

Evidências de uma estratégia ainda mais astuta na desestabilização do controle desse circuito foram encontradas nos genomas de um pequeno número de melanomas familiares e esporádicos. Nesses cânceres, mutações pontuais no gene CDK4 (mutação R24C) criam moléculas de CDK4 que não mais são suscetíveis à inibição pela família de moléculas INK4 (i. e., p15, p16, p18 e p19). Enquanto esses vários inibidores de CDKs podem estar perfeitamente intactos e funcionais em tais células tumorais, seu alvo CDK4 agora esquiva-se deles. Mais uma vez, isso permite à CDK4, juntamente com suas parceiras ciclinas D, dirigir as etapas iniciais da fosforilação de pRb de forma desregulada. (Desde que a mutação R24C cria um alelo dominante da CDK4 [em nível celular], somente uma das duas cópias do gene que codifica esta CDK precisa ser mutada para que uma célula cancerosa beneficie-se sob o ponto de vista proliferativo.)

O inibidor de CDK mais crítico envolvido na patogênese do câncer pode muito bem ser a p27^{Kip1}. Como mencionado anteriormente, p27^{Kip1} está envolvida na inibição da atividade de complexos da ciclina E-CDK2 (p. ex., veja a Figura 8.15). À medida que as células deixam o ciclo celular entrando na fase G₀ de quiescência, os níveis da p27^{Kip1} aumentam (Figura 8.37A). Quando as células entram novamente no ciclo celular e avançam em direção à G₁, os níveis de p27^{Kip1} são reduzidos progressivamente durante o início e a metade de G₁ e depois

Figura 8.36 Amplificação do gene da ciclina D1 O uso de hibridização *in situ* baseada em fluorescência (FISH) torna possível detectar o número de cópias de genes específicos em seções histológicas. Nesta figura, vemos o resultado do emprego de uma sonda para *CCND1*, o gene humano que codifica a ciclina D1, para analisar o número de cópias deste gene nas células de carcinoma escamoso de cabeça e pescoço (HNSCC). Cada ponto brilhante representa uma única cópia do gene. Núcleos individuais estão corados em *púrpura*. Assim, *CCND1* é amplificado em diferentes intensidades aqui, estando presente em três a cinco cópias por célula neste tumor. Em geral, o gene *CCND1* pode ser amplificado em aproximadamente um terço de todos esses tumores, levando a aumentos correspondentes na expressão da ciclina D1 e resultando em perda do controle da fosforilação da pRb. Observações similares (*não-mostradas*) podem ser feitas com células de câncer de mama. (De K. Feier et al., *Cancer Res*, 61:1179-1182, 2003.)



decrecem drasticamente durante a fase tardia de G_1 pelas ações dos complexos ciclina E-CDK2. Esses baixos níveis não são criados pela diminuição da atividade de transcrição do gene que codifica a $p27^{Kip1}$. Em vez disso, parece que os níveis de $p27^{Kip1}$ são reduzidos pela ação da proteína Skp2, que age em conjunto com Cul1 e várias outras proteínas (Figura 8.37B) para reconhecer e ubiquitinar $p27^{Kip1}$, marcando-a para destruição em proteossomos. De fato, os níveis declinantes de Skp2 explicam o aumento em $p27^{Kip1}$ à medida que as células adentram G_0 (veja a Figura 8.37A e C).

A relação inversa entre os níveis de $p27^{Kip1}$ e aqueles de Skp2 é especialmente aparente em vários cânceres humanos. Assim, em carcinomas de mama e de boca, bem como em linfomas, os níveis de $p27^{Kip1}$ são inversamente relacionados com os níveis de Skp2 (veja, por exemplo, a

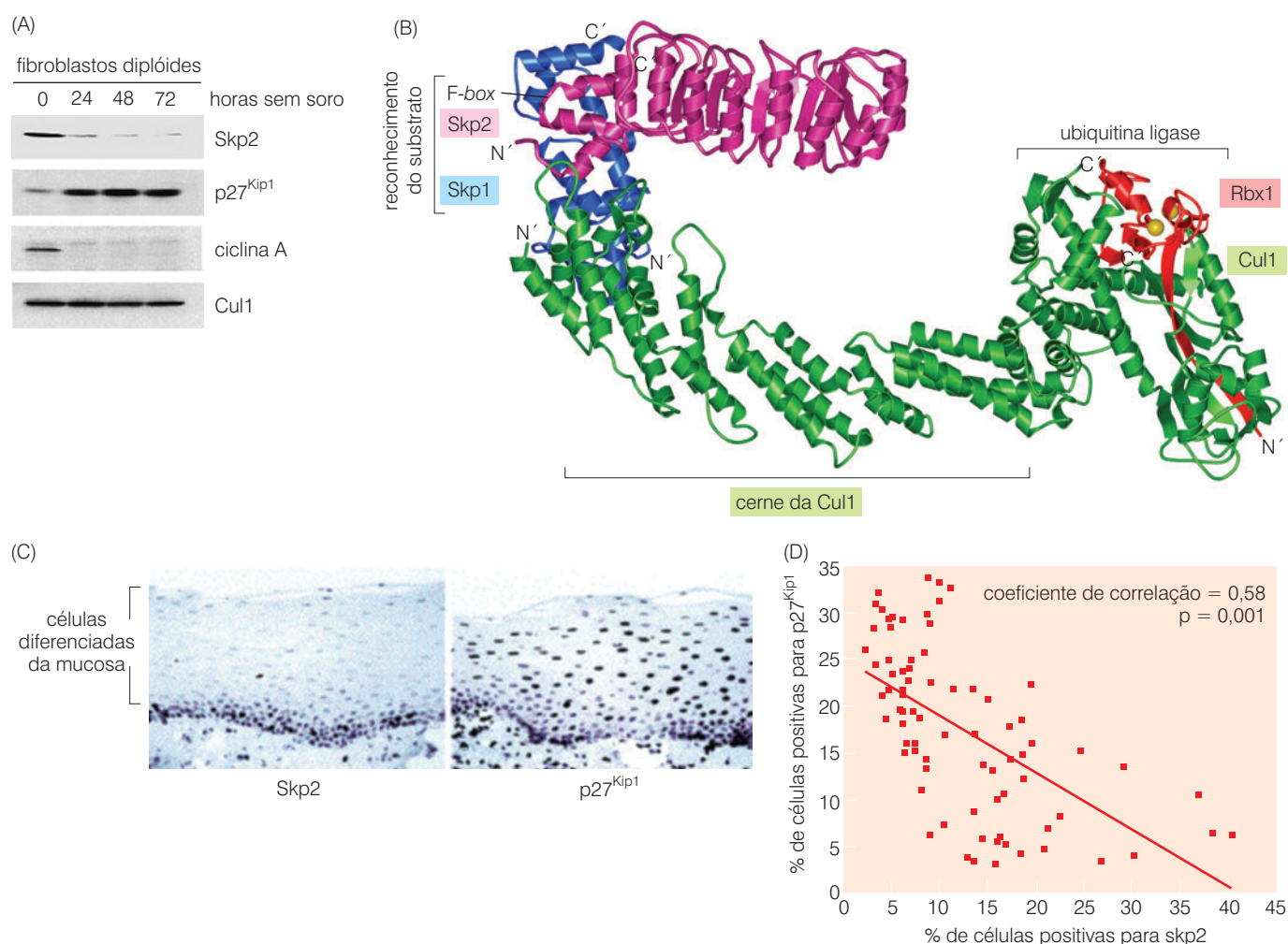


Figura 8.37 Supressão dos níveis de $p27^{Kip1}$ por Skp2. Dentre os fatores de controle dos níveis da $p27^{Kip1}$, estão os níveis do complexo SCF^{Skp2} , que constitui uma ubiquitinina ligase E3 (Barra lateral 7.8) que ubiquitina a $p27^{Kip1}$, assim marcando-a para degradação nos proteossomos. (A) À medida que células normais humanas entram na fase G_0 de quiescência, neste caso pela ausência de mitógenos do soro, os níveis de Skp2 diminuem, permitindo o acúmulo da $p27^{Kip1}$; esta, por sua vez, é responsável pelo bloqueio das ações da CDK2, que é crítica para o avanço pela fase tardia de G_1 . (B) Skp2 (rosa), que é responsável pelo reconhecimento do substrato $p27^{Kip1}$, associa-se a várias outras proteínas para formar este complexo. Dentre essas, se encontra a Skp1 (azul), a proteína Cul1 (verde), cuja expressão é induzida por Myc (Seção 8.9, Figura 8.28), e a proteína Rbx1 (vermelho); esta última liga-se a uma ubiquitinina ligase E2 que é

responsável pela transferência de uma *moiety* da ubiquitina para a $p27^{Kip1}$. A Cul1 agindo como um suporte mantém os dois extremos do complexo afastados 100 Ångströms, que é importante para a ubiquitinação do substrato. (C) Como mostrado nesta figura na mucosa oral normal, quando os níveis da Skp2 estão baixos (à esquerda), os níveis da $p27^{Kip1}$ estão altos (à direita) e ajudam a manter as células em um estado pós-mitótico; a situação oposta é observada em vários cânceres (não-mostrado). (D) A relação inversa entre os níveis da Skp2 e aqueles da $p27^{Kip1}$ foi distribuída aqui para um grande número de displasias epiteliais orais e carcinomas. (Relações similares, não-mostradas, são vistas em linfomas e carcinomas colorretais.) (A, de T. Bashir et al., *Nature* 428:190-193, 2004; B, de B. Schulman et al., *Nature* 408:381-386, 2000 e N. Zheng et al. *Nature* 416:703-709, 2002; C e D, de M. Gstaiger, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:5043-5048, 2001.)

Figura 8.37D), com níveis mais altos de Skp2 significando tempo de sobrevivência mais curto para pacientes. Além disso, quando os níveis de p27^{Kip1} são medidos nas células de carcinomas humanos de esôfago, mama, colorretal e de pulmão, tem-se observado uma correlação entre a baixa sobrevivência dos pacientes com os baixos níveis desse inibidor CDK. Em todos esses tumores, Skp2 parece agir como uma oncoproteína promotora de crescimento que atua por meio da degradação do inibidor de proliferação p27^{Kip1}. Uma pista sobre a fonte dos níveis elevados de Skp2 vem da pesquisa indicando que a proteína Notch (Seção 6.12), que se apresenta hiperativa em vários tipos de câncer humano, aumenta a transcrição do gene que codifica para Skp2.

Temos repetidamente lido a respeito do estado hiperativo da cinase Akt/PKB em muitos tumores humanos, que é causado por uma variedade de defeitos moleculares, incluindo hiperatividade de receptores para fatores de crescimento, perda da proteína supressora de tumores PTEN e mutações em PI3K. Isso também tem efeitos sobre o relógio do ciclo celular em células cancerosas pela redução dos níveis efetivos de importantes inibidores de CDK (veja a Figura 8.15). Ao fosforilar p21^{Cip1} e p27^{Kip1}, Akt/PKB assegura a localização citoplasmática desses dois antagonistas críticos do avanço do ciclo celular, marginalizando-os. Ao mesmo tempo, Akt/PKB pode suprimir a expressão do gene que codifica para p27^{Kip1} por meio da fosforilação de um fator de transcrição da família Forkhead. Este último fator de transcrição serve para reduzir ainda mais as concentrações da p27^{Kip1} na célula.

Na Seção 8.9, aprendemos sobre as várias maneiras pelas quais a proteína Myc, operando em células normais, estende seu domínio sobre o relógio do ciclo celular e aciona várias alavancas reguladoras importantes. As ações da oncoproteína Myc são possivelmente semelhantes sob um ponto de vista qualitativo. A diferença entre ambos é, em grande parte e, talvez, totalmente, uma questão dos níveis de proteína: em células normais, os níveis da proteína Myc são muito dependentes de fatores de crescimento mitogênicos extracelulares. Entretanto, em várias células cancerosas, a proteína Myc é produzida constitutivamente, independentemente da entrada de sinais mitogênicos na célula.

Com essa idéia em mente, podemos deduzir que muitas das perturbações causadas pela proteína Myc são amplificadas nos muitos tipos de células cancerosas humanas que carregam tanto oncogenes *myc* quanto as versões oncogênicas de suas primas, *N-myc* e *L-myc*. Dentre os muitos produtos induzidos por Myc, as proteínas Id podem muito bem ter a maior importância fisiológica. Elas podem atuar como proteínas inibidoras dominantes negativas dos fatores de transcrição bHLH. Por outro lado, elas podem ligar-se a pRb e inibir seu funcionamento de uma forma que se assemelha às ações de oncoproteínas virais como o “large T”, E7 e E1A.

De fato, a proteína Id1 expressa ectopicamente pode repor as ações de ligação da pRb executadas pelo antígeno “large T” do vírus SV40 em experimentos desenhados para reverter o estado quiescente de crescimento das células. Tem sido demonstrado que essa proteína Id em particular é superproduzida em tumores do endométrio, de cabeça e pescoço, mama, pâncreas, esôfago e carcinomas cervicais, bem como melanomas e neuroblastomas. Sua expressão tem sido positivamente correlacionada com o grau de malignidade e invasibilidade de muitos desses tipos de tumores.

As diversas estratégias genéticas e bioquímicas mostradas na Figura 8.35 têm todas um objetivo comum – o de devastar e desregular a função de pRb, destruindo o rígido controle que é normalmente imposto na transição pelo ponto R. A seleção natural darwiniana ocorrendo no microcosmo dos tecidos vivos favorece o crescimento além dos limites de células que, por vários meios, tiveram sucesso em inativar o mecanismo supressivo exercido por pRb, com isso desregulando o processo de transição pelo ponto R.

8.13 Sinopse e perspectivas

Todos os sinais fisiológicos e rotas de sinalização que afetam a proliferação celular devem, mais cedo ou mais tarde, ser conectados de alguma forma às operações do relógio do ciclo celular. Ele representa o cérebro da célula – o processador central que recebe sinais aferentes

de diversas fontes integrando-os e tomando as decisões finais com relação a crescimento *versus* quiescência. No caso deste último, o sistema deverá decidir se a saída do ciclo celular ativo será reversível. Ligado a esta última decisão estão os mecanismos que governam a entrada em programas de diferenciação que são específicos para diferentes tecidos.

Os componentes centrais do relógio do ciclo celular estão presentes em formas conhecidas em eucariotos unicelulares, incluindo o bem estudado fermento de padeiro, o *Saccharomyces cerevisiae*. Organismos unicelulares como este respondem a um número significativamente menor de sinais externos do que células de metazoários residindo em tecidos complexos. Esses simples organismos carecem dos mais de cem tipos de receptores para fatores de crescimento que as células de vertebrados apresentam em suas superfícies, bem como outros receptores tais como integrinas que nossas células usam para sentir e controlar a adesão à matriz extracelular. Leveduras não têm receptores para inibição do crescimento, como receptores de TGF- β , que desempenham esse papel-chave na economia dos tecidos dos mamíferos.

Tudo isso explica por que a fiação periférica que regula o centro da maquinaria do ciclo celular de células animais foi apenas recentemente adicionada à história de vida neste planeta – talvez há 600 milhões de anos quando os metazoários apareceram. A necessidade de responder a uma ampla variedade de sinais aferentes explica por que tantos níveis distintos de regulação foram impostos sobre o cerne da maquinaria. Sem esses reguladores acessórios, notavelmente os inibidores de CDKs, o cerne da maquinaria não seria capaz de responder aos diversos sinais gerados em células metazoárias e que regulam sua proliferação.

Enquanto essas conexões entre o meio extracelular e o relógio do ciclo celular estavam sendo formadas, outros reguladores críticos tornaram-se integrados a esse complexo circuito. Na verdade, a invenção dos governadores-chave da progressão por G_1 – pRb e suas proteínas-primas, p107 e p130 – parece ter ocorrido bem antes do surgimento dos metazoários: uma rota de sinalização mediada por pRb-E2F envolvida no controle do ciclo celular está presente na *Chlamydomonas reinhardtii*, uma alga unicelular que está relacionada aos ancestrais das plantas terrestres. Proteínas similares à pRb e E2F estão presentes em vermes e moscas, indicando sua existência em metazoários primitivos.

Talvez a pRb não tenha sido a primeira dessas três proteínas tipo *pocket* que evoluiu, mas, durante a ascendência dos mamíferos, ela ganhou a primazia em governar a decisão crítica feita no ponto R. Essas três proteínas controlam vários aspectos da decisão a ser tomada pela célula entre crescimento ou quiescência e assim localizam-se *upstream* do relógio do ciclo celular. Ao mesmo tempo, ao afetar a transcrição do gene, essas proteínas criam um mecanismo de acoplamento entre o relógio do ciclo celular e os circuitos localizados *downstream* e que precisam ser ativados para que as células executem as complexas mudanças bioquímicas que as permitem adentrar a fase S.

Parte do estado de crescimento neoplásico pode ser explicada pela ação do relógio do ciclo celular. Podemos explicar a proliferação descontrolada das células cancerosas pela ação da pRb e das moléculas que controlam seu estado de fosforilação. Sem a pRb no controle do leme, os requerimentos das ações promotoras de crescimento de oncoproteínas como a Ras são bastante reduzidas, e as células avançam por G_1 sem preencher muitos dos pré-requisitos que normalmente determinam se a transição pelo ponto R ocorrerá ou não. O casamento entre proliferação e bloqueio da diferenciação, ainda que não completamente compreendido, parece ser atribuível às operações de proteínas como Myc, a qual simultaneamente move o relógio do ciclo celular a frente através de G_1 e antagoniza alguns dos principais reguladores dos programas de diferenciação.

Talvez surpreendentemente, um importante aspecto do controle proliferativo das células opera independentemente do relógio do ciclo celular. Como veremos no Capítulo 10, células normais podem sofrer replicação somente por um número limitado de vezes antes de perder sua habilidade de continuar a proliferar. Células cancerosas têm um poder proliferativo ilimitado – o fenótipo da **imortalidade replicativa**. Os aparatos moleculares presentes no interior das células que registram o número de gerações de replicação pelas quais uma linhagem de células

passou estão embutidos no DNA cromossomal e não parecem ser controlados pelos complexos ciclina-CDK que regulam o avanço pelo ciclo celular.

Além disso, outros aspectos do programa de crescimento de células malignas não são controlados pelo relógio do ciclo celular. As células respondem a severo, essencialmente irreparável dano por meio da ativação de seu programa de suicídio – a apoptose; essa resposta não parece estar conectada diretamente à maquinaria do ciclo celular. Esse programa será objeto de grande parte das discussões do próximo capítulo.

Muitas outras peculiaridades do fenótipo da célula cancerosa são predominantemente uma extensão de proteínas citoplasmáticas como Ras. Incluídos aqui estão fenótipos de motilidade celular, mudanças na morfologia, independência de ancoragem, alterações no metabolismo energético e invasibilidade. Esses comportamentos também estão fora do controle pelo relógio do ciclo celular, o qual exerce sua função no núcleo.

Apesar da falta de regulação que o ciclo celular sofre em células cancerosas, reconhecemos que somente uma pequena porção da maquinaria do ciclo celular está alterada nessas células – especificamente, aqueles componentes que governam o avanço pela fase G_1 do ciclo celular. Podemos entender isso ao notar que a transição pelo ponto R que ocorre no final de G_1 representa uma decisão crítica na vida da célula; essa decisão deve ser desregulada se as células cancerosas ganharem vantagens proliferativas. Entretanto, uma vez que uma célula tenha passado o ponto R e chegado a transição G_1/S , as etapas remanescentes do ciclo celular procedem de uma forma pré-programada essencialmente automática. Da mesma forma, as fases S, G_2 , e M das células cancerosas, que em conjunto representam um extraordinário e complexo programa de etapas bioquímicas e biológicas, lembram as fases do ciclo celular de células normais. Isso ajuda a explicar um aspecto frequentemente observado em células cancerosas: seus ciclos de crescimento e divisão não são necessariamente mais curtos do que aqueles de células normais. Em vez disso, células cancerosas continuam a adentrar esses ciclos e, assim, continuam a proliferar sob condições que forçariam células normais a interromper a proliferação (veja, p. ex., a Figura 7.32).

Em adição aos reguladores críticos da progressão por G_1 , o único outro componente do relógio do ciclo celular que parece ser afetado pelo estado de crescimento maligno é o pequeno grupo de proteínas que servem como controle dos pontos de verificação durante as fases S e M, notavelmente estas funcionando na transição de G_1/S e durante as fases S e M. Sua inativação, que ocorre em alguns tipos de câncer, não é dirigida ao objetivo imediato de desregular a proliferação. Em vez disso, a inativação desses controles do ponto de verificação serve para desestabilizar o genoma celular, permitindo às células cancerosas incipientes gerar inúmeras permutações do genoma humano normal. Tais células e seus descendentes são então particularmente úteis em permitir o crescimento neoplásico. Retornaremos ao tema da desestabilização genômica no Capítulo 12.

Grandes lacunas nesse cenário ainda permanecem abertas. Ainda não entendemos realmente por que a inativação da pRb é tão importante na criação de células cancerosas, ao passo que a inativação de suas duas proteínas-primas, p107 e p130, parece raramente ser uma prioridade durante o processo de tumorigênese. Não entendemos como a decisão entre proliferação e diferenciação é feita na grande maioria das células do corpo. Parecem ser relevantes as observações indicando que a pRb interage com vários outros fatores de transcrição além dos muito estudados E2Fs. Alguns desses outros fatores de transcrição podem governar a expressão de genes que contribuem com certos programas de diferenciação. Ainda não entendemos quantas oncoproteínas que funcionam como fatores de transcrição (Tabela 8.2) perturbam as ações do relógio do ciclo celular. Além disso, muitos dos conceitos atualmente sustentados sobre as ações do relógio do ciclo celular como descritas nesse capítulo poderão, um dia, requerer uma revisão substancial (Barra lateral 8.8).

Apesar de termos lido a respeito dos detalhes do controle do ciclo celular e das várias maneiras pelas quais ele é rompido em muitos tipos de células cancerosas, a motivação final por trás dessas discussões é uma necessidade de entender doenças clínicas: como essas alterações afe-

Barra lateral 8.8 Sabemos menos do que pensamos sobre o relógio do ciclo celular Estudos de camundongos geneticamente alterados, reportados nos primeiros anos do novo milênio, indicam que a descrição da maquinaria do ciclo celular, como apresentado neste capítulo, necessitarão ser revisados. Por exemplo, embriões de camundongos mutantes que foram privados de ambas as cópias de cada um dos três genes de ciclina tipo D (i. e., com um genótipo $D1^{-/-} D2^{-/-} D3^{-/-}$) são capazes de passar pela maioria dos estágios do desenvolvimento embrionário, alguns morrendo apenas no 16º dia embrionário. As discussões neste capítulo não fornecem pista de como as células desses embriões têm sucesso em avançar por vários ciclos de crescimento e divisão sem as ciclinas tipo D que dirigem o seu avanço pela fase G_1

do ciclo celular. Similarmente, embriões de camundongo que não têm ambas as cópias de cada um dos dois genes de ciclina E (i. e., com um genótipo $E1^{-/-} E2^{-/-}$) se desenvolvem até a metade da gestação, em que eles morrem por defeitos da placenta; se estes são resolvidos, então os embriões podem se desenvolver a termo, morrendo em seguida. Mais uma vez, os modelos existentes não fornecem nenhuma pista de como suas células são capazes de completar as últimas etapas da fase G_1 e iniciar a fase S do ciclo celular. Esses resultados impressionantes poderiam sugerir as operações de um relógio do ciclo celular normalmente latente, possivelmente herdado de nossos ancestrais protozoários, que é capaz de aumentar na ocasião e tomar o comando quando a maquinaria mais moderna do ciclo celular de metazoários falha em realizar o seu trabalho.

tam a progressão tumoral e a resposta do paciente? De fato, perdas da função de pRb podem ter efeitos notáveis sobre o comportamento de células cancerosas e, por consequência, sobre os tumores. Por exemplo, como indicado na Figura 8.38, níveis anormalmente altos da ciclina E em células de carcinoma de mama têm forte valor preditivo de malignidade agressiva e resposta desfavorável por parte do paciente, enquanto baixos níveis indicam longa sobrevivência livre da doença. Nesse caso, a expressão do RNA mensageiro da ciclina E pode estar elevada, e os mecanismos de degradação que normalmente são responsáveis pela redução dos níveis da ciclina E estão provavelmente comprometidos. Os níveis de ciclina E excessivamente elevados resultantes causam a fosforilação de pRb e sua inativação. Observações como essa fornecem indicações de que o relógio do ciclo celular é, em seu estado normal, um importante

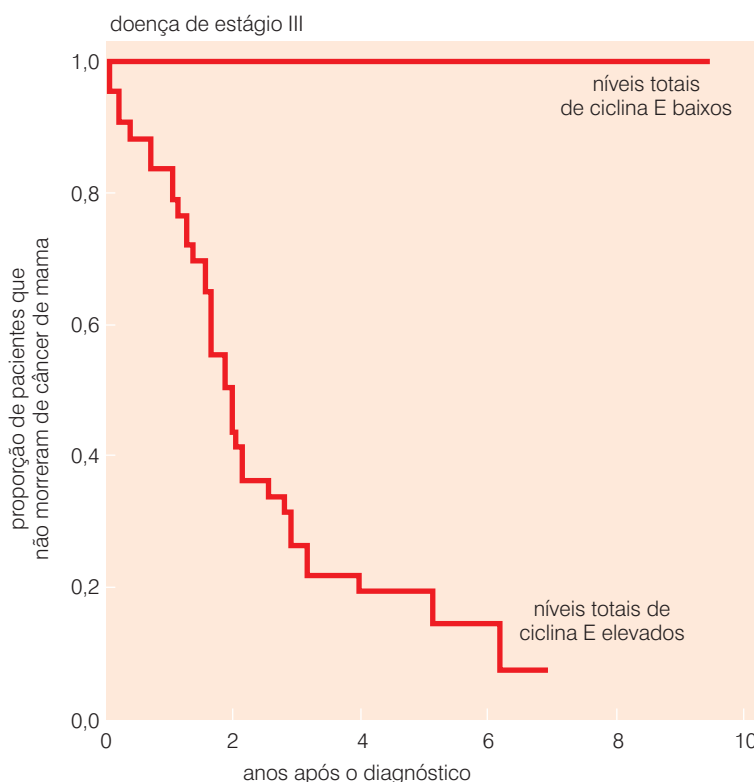


Figura 8.38 A ciclina E e a progressão do câncer de mama Este gráfico de Kaplan-Meier apresenta a progressão clínica da doença em mulheres com câncer de mama em estágio III, isto é, aqueles apresentando tumores primários relativamente grandes e células cancerosas em linfonodos regionais, mas sem metástases detectáveis em sítios anatômicos distantes. O gráfico apresenta a fração de pacientes (*ordenadas*) que ainda estão vivos nos tempos indicados após o diagnóstico inicial (*abscissas*). (De K. Keyomarsi et al., *N. Engl. J. Med.* 347:1566-1575, 2002.)

bloqueador do desenvolvimento do câncer e, quando desarrumado por várias lesões, um potente agente promotor da progressão do câncer.

Nossas discussões sobre a pRb e o controle do ciclo celular sugerem a proeminente importância dessa proteína dentre todos os muitos produtos de genes supressores de tumor. De fato, a pRb divide essa posição com uma segunda proteína, p53, que tem um papel igualmente importante na fisiologia de células normais e desenvolvimento do câncer. Em essência, o circuito da pRb lida com as relações entre a célula e o mundo externo. O circuito da p53 tem uma função muito diferente, pois ela monitora o bem-estar interno da célula e permite a proliferação e sobrevivência celular somente se todos os sistemas vitais operantes da célula estão funcionando apropriadamente. Como veremos no próximo capítulo, a inativação da rota de sinalização da p53 é tão importante ao desenvolvimento de células cancerosas quanto a desregulação dos controles que governam a pRb e a transição pelo ponto R.

Conceitos-chave

- O ciclo celular constitui uma série de eventos precisamente programados que permitem a uma célula duplicar seu conteúdo e gerar duas células-filhas. Essa série de eventos é controlada pela maquinaria que frequentemente é denominada relógio do ciclo celular.
- A maquinaria que constitui o relógio do ciclo celular parece operar similarmente em todos os tipos de células do corpo.
- O relógio do ciclo celular utiliza uma subfamília de serina/treonina proteína cinases – as cinases dependentes de ciclinas (CDKs) – para executar as várias etapas do ciclo celular.
- Etapas específicas do ciclo celular são controladas pela mudança nos níveis e disponibilidade de ciclinas, que funcionam pela ativação da função catalítica de seus CDKs correspondentes.
- As ciclinas do tipo D carregam informações sobre os sinais extracelulares mitogênicos ao cerne da maquinaria do ciclo celular, ao passo que as ciclinas remanescentes operam em um programa pré-determinado, uma vez que a decisão de ultrapassar a fase G_1 tenha sido tomada.
- Os controles dos pontos de verificação que operam no decorrer do ciclo celular asseguram que uma nova etapa na progressão do ciclo celular não será alcançada antes que a etapa anterior tenha sido concluída. Muitos tipos de células cancerosas têm um ou mais desses pontos de verificação inativados, o que os ajuda a acumular os genes mutantes e cariótipos alterados que propulsionam seu crescimento neoplásico.
- As decisões críticas relativas a crescimento ou quiescência são feitas na fase G_1 do ciclo celular. Em células normais, a decisão de crescer e replicar requer sinais do meio externo (por isso a dependência dos níveis de ciclinas D nos sinais mitogênicos). Após isso, o avanço através das outras fases do ciclo celular é relativamente independente dos sinais externos.
- O ponto de restrição R (ponto R) representa um ponto no qual a célula compromete-se, de modo irrevogável, a completar o restante do ciclo celular ou, alternativamente, permanecer em G_1 e possivelmente recuar do ciclo celular ativo para G_0 , o estado de quiescência. A desregulação da maquinaria decisória do ponto R acompanha a formação da maioria dos tipos de células cancerosas, uma vez que ela leva à proliferação celular sem restrições.
- A decisão entre crescer ou quiescer é governada pelo estado de fosforilação da proteína do retinoblastoma, a pRb. As ciclinas D e a ciclina E controlam o grau de fosforilação de pRb. A hipofosforilação da pRb bloqueia a passagem pelo ponto R, enquanto a pRb hiperfosforilada permite tal passagem.
- pRb controla a passagem pelo ponto R por meio da ligação ou liberação dos fatores de transcrição E2F associados a promotores de genes que conduzem a célula da fase G_1 para S. A pRb hipofosforilada liga-se às E2Fs, enquanto a pRb hiperfosforilada as libera. Quando oncoproteínas virais estão presentes, estas mimetizam o estado de hiperfosforilação de pRb pelo impedimento de sua ligação às E2Fs.
- Em células cancerosas, mecanismos alternativos operam para assegurar que a proliferação celular não será restringida pela pRb. Muitos desses mecanismos agem hiperfosforilando

a pRb e resultam em inativação funcional. Em contrapartida, isso causa a proliferação descontrolada dessas células.

- A função de pRb pode ser perdida de várias maneiras, incluindo: sinais mitogênicos excessivos (desde que esses levem a níveis elevados de ciclinas D, que então iniciam a inativação da pRb por meio da fosforilação); mutação do gene *Rb*; ligação de pRb a uma oncoproteína viral (p. ex., HPV E7); e ações de oncoproteínas celulares (p. ex., Myc) que desregulam a fosforilação da pRb ou diretamente afetam a atividade da pRb.
- O controle da diferenciação celular é casado à regulação da progressão do ciclo celular. A hipofosforilação da pRb é necessária para interromper a proliferação das células e facilitar sua diferenciação. Inversamente, outras proteínas regulatórias, como Myc e Ids, agem para inibir a diferenciação celular.
- Na maioria dos cânceres, a diferenciação é parcial ou completamente bloqueada. Em geral, quanto mais diferenciadas as células constituintes do tumor, menos agressivo é o câncer.

Questões elaboradas

1. Por que a função de pRb está comprometida em tumores humanos por meio de mutações em seu gene enquanto nos genes que codificam suas duas proteínas-primas, p107 e p130, nunca foram detectadas mutações nos genomas de células cancerosas?
2. Por que os vírus de DNA tumorais evoluíram em sua habilidade de inativar a função de pRb?
3. Como pode a perda de função de um inibidor de CDK afetar o controle do avanço do ciclo celular?
4. Que mecanismos moleculares operam para assegurar que, uma vez tomada a decisão de avançar além do ponto de restrição isso levará a um comprometimento irreversível no sentido de completar as fases remanescentes do ciclo celular até a fase M?
5. Como são as decisões de crescer ou permanecer quiescente mecanisticamente casadas com as decisões governando a diferenciação celular? Por que esses dois processos devem ser rigidamente casados?
6. Como as células asseguram que as funções de ativação da transcrição dos fatores de transcrição E2F serão limitadas a uma estreita janela de tempo durante o ciclo celular? O que poderia ocorrer se à E2F fosse permitido exercer sua função continuamente durante o ciclo celular?
7. De que maneiras a oncoproteína Myc desregula a proliferação e diferenciação?
8. Por que é importante que o relógio do ciclo celular nunca se movimente em sentido inverso? E que mecanismos estão agindo para assegurar que isso não ocorra?

Leitura adicional

- Bashir T & Pagano M (2003) Aberrant ubiquitin-mediated proteolysis of cell cycle regulatory proteins and oncogenesis. *Adv. Cancer Res.* 65, 101–144.
- Blagosklonny MV & Pardee AB (2001) The restriction point of the cell cycle. In *Cell cycle checkpoints and cancer* (MV Blagosklonny ed), pp 52–64. Georgetown, TX: Landes Bioscience.
- Blais A & Dynlacht BD (2004) Hitting their targets: an emerging picture of E2F and cell cycle control. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 14, 527–532.
- Bloom J & Pagano M (2003) Deregulated degradation of the cdk inhibitor p27 and malignant transformation. *Semin. Cancer Biol.* 13, 41–47.
- Classon M & Dyson N (2001) p107 and p130: versatile proteins with interesting pockets. *Exp. Cell Res.* 264, 135–147.
- Classon M & Harlow E (2002) The retinoblastoma tumour suppressor in development and cancer. *Nat. Rev. Cancer* 2, 910–917.
- DeSalle LM and Pagano M (2001) Regulation of the G1 to S transition by the ubiquitin pathway. *FEBS Lett.* 490, 179–189.
- Dyson N (1998) The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev.* 12, 2245–2262.
- Eisenman RN (2001) Deconstructing Myc. *Genes Dev.* 15, 2023–2030.
- Harbour JW & Dean DC (2000) The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms. *Genes Dev.* 14, 2293–2409.
- Hasskarl J & Münger K (2002) Id proteins—tumor markers or oncogenes? *Cancer Biol. Ther.* 1, 91–96.
- Hunter T & Pines J (1994) Cyclins and cancer II: cyclin D and CDK inhibitors come of age. *Cell* 79, 573–582.
- Levens D (2002) Disentangling the MYC web. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 5757–5759.
- Liu H et al. (2004) New roles for the RB tumor suppressor protein. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 14, 55–64.
- Look AT (1997) Oncogenic transcription factors in the human acute leukemias. *Science* 278, 1059–1064.

- Lutz W, Leon J & Eilers M (2002) Contributions of Myc to tumorigenesis. *Biochim. Biophys. Acta Revs. Cancer* 1602, 61–71.
- Malumbres M & Barbacid M (2001) To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 1, 222–231.
- Marcu KB, Bossone SA & Patel AJ (1992) *myc* function and regulation. *Annu. Rev. Biochem.* 61, 809–860.
- Massagué J (2000) How cells read TGF- β signals. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1, 169–178.
- Massagué J (2004) G1 cell-cycle control and cancer. *Nature* 432, 298–307.
- Massari ME & Murre C (2000) Helix-loop-helix proteins: Regulators of transcription in eucaryotic organisms. *Mol. Cell Biol.* 20, 429–440.
- Mulligan G & Jacks T (1998) The retinoblastoma gene family: cousins with overlapping interests. *Trends Genet.* 14, 223–229.
- Nevins JR (1992) E2F: a link between the Rb tumor suppressor protein and viral oncoproteins. *Science* 258, 424–429.
- Nevins JR (2001) The Rb/E2F pathway and cancer. *Hum. Mol. Genet.* 10, 699–703.
- Perk J, Iavarone A & Benezra R (2005) Id family of helix-loop-helix proteins in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 5, 603–614.
- Reed S (2003) Ratchets and clocks: the cell cycle, ubiquitylation and protein turnover. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 855–864.
- Reiss M (1999) TGF- β and cancer. *Microbes infect.* 1, 1327–1347.
- Sherr CJ (1996) Cancer cell cycles. *Science* 274, 1672–1677.
- Sherr CJ (1998) Tumor surveillance via the ARF-p53 pathway. *Genes Dev.* 12, 2984–2991.
- Sherr CJ (2001) The INK4a/ARF network in tumour suppression. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 731–737.
- Sherr CJ & McCormick F (2002) The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell* 2, 103–112.
- Sherr CJ & Roberts JM (1999) CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.* 13, 1501–1512.
- Siegel PM & Massagué J (2003) Cytostatic and apoptotic actions of TGF- β in homeostasis and cancer. *Nat. Rev. Cancer* 3, 807–820.
- Slingerland J & Pagano M (2000) Regulation of the cdk inhibitor p27 and its deregulation in cancer. *J. Cell Physiol.* 183, 10–17.
- Tapon N, Moberg KH & Hariharan IK (2001) The coupling of cell growth to the cell cycle. *Curr Opin. Cell Biol.* 13, 731–737.
- Trimarchi JM & Lees JA (2002) Sibling rivalry in the E2F family. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 11–20.
- Yamasaki L & Pagano M (2004) Cell cycle, proteolysis and cancer. *Curr Opin. Cell Biol.* 16, 623–628.



CAPÍTULO 9

p53 e Apoptose: Guardião e Executor

“Para examinar as causas da vida, devemos primeiro recorrer à morte.”
Mary Shelley, *Frankenstein*, 1831

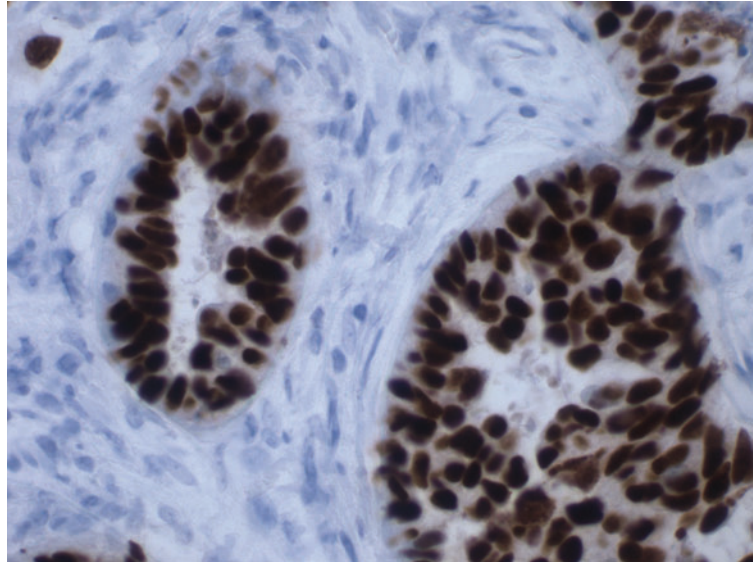
“Não pode haver, entretanto, a mínima dúvida de que os organismos superiores, como são agora formados, contenham dentro de si as origens da morte.”

August Weissmann, filósofo de biologia, 1889

Organismos metazoários possuem um interesse vital em eliminar células defeituosas ou em mau funcionamento de seus tecidos. Em resposta a tal necessidade, os mamíferos possuem um fiel guardião em suas células. Dentro de quase todas as células dos tecidos desses organismos, a proteína p53 atua como o representante local de seus interesses. Ela está presente para assegurar que a célula mantenha seus componentes em ordem.

Caso p53 receba informação sobre uma desordem metabólica ou algum dano genético dentro de uma célula, ela poderá deter o avanço dessa célula por meio de seu ciclo de crescimento e divisão e, ao mesmo tempo, coordenar respostas localizadas na célula em questão para facilitar o reparo do dano. Se p53 assimila que a desordem metabólica ou o dano ao genoma é muito grave para ser reparado, ela poderá decidir emitir sinais que desencadeiem o programa suicida normalmente latente das células – a **apoptose**. A consequência disso é a rápida morte celular. Este evento resulta na eliminação de uma célula que, se continuasse em crescimento e divisão, poderia acarretar o comprometimento da viabilidade do organismo.

Figura 9.1 Antígeno “large T” em células transformadas com SV40. Anticorpos que ligam o antígeno “large T” de SV40 (LT) podem ser usados para detectar LT no núcleo de células tumorais transformadas com SV40. No presente caso, tais anticorpos têm sido utilizados para marcar células epiteliais mamárias humanas (MECs) que foram transformadas por introdução da região inicial de SV40 adicionada de outros dois genes. Uma imagem similar poderia ser vista caso tais anticorpos fossem utilizados para marcar células de camundongos transformadas com SV40. LT foi detectado por meio da ligação dessas moléculas de anticorpos à enzima peroxidase, gerando os pontos marrom-escuros. Nesta imagem de um xenoinxerto tumoral, MECs transformadas (vistas nos cortes transversais) formam canais, os quais são circundados por células normais do estroma (*núcleos azul-claros*). (Cortesia de T.A. Ince.)



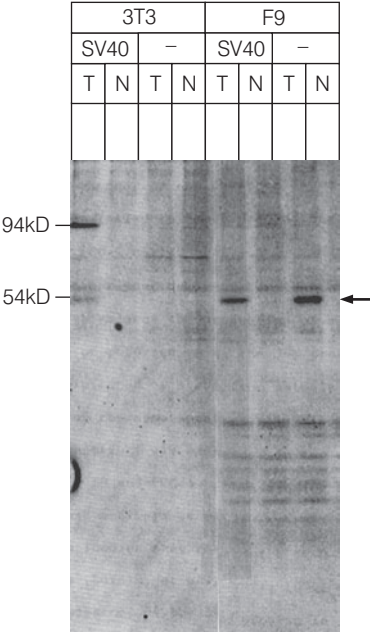
O programa apoptótico, que pode ser ativado por p53, está incorporado dentro dos circuitos de controle da maioria das células pelo corpo. A apoptose consiste em uma série de mudanças celulares distintas que operam para assegurar o desaparecimento de todos os traços de uma célula, ocorrendo, várias vezes, dentro de uma hora antes de sua ativação inicial. A presença contínua de uma maquinaria apoptótica latente, porém intacta, representa um tratamento para uma célula cancerosa incipiente, já que essa maquinaria é equilibrada para eliminar células que estão em processo de se tornar neoplásicas. Isso explica por que a ação de p53 deve ser interrompida antes que um clone de células pré-malignas alcance estabilidade dentro de um tecido. Sem uma clara descrição da função de p53 e da apoptose, não temos esperança em entender o componente fundamental do processo que leva à criação de, virtualmente, todos os tipos de tumores humanos.

9.1 Papovavírus leva à descoberta de p53

Quando células murinas que foram transformadas com o vírus de tumor de DNA SV40, são injetadas em um camundongo com mesma identidade genética (i. e., um hospedeiro *singênico*), o sistema imune do hospedeiro reage por meio de uma forte resposta; anticorpos são produzidos e reagem contra uma proteína nuclear que está presente nas células transformadas com o vírus, não sendo possível detectá-la em células murinas normais (Figura 9.1). Essa proteína, o antígeno tumoral grande (large T, LT), é codificada por uma região do genoma viral que também é expressa quando o vírus infecta e se multiplica dentro de células renais de macaco – células hospedeiras que permitem que ocorra um ciclo de infecção completo (ciclo lítico) (Seção 3.4).

LT é uma proteína multifuncional que o vírus SV40 utiliza para perturbar diversos circuitos regulatórios distintos dentro de células infectadas e transformadas. Além disso, LT foi citada no capítulo anterior em virtude de sua habilidade em se ligar e inativar funcionalmente pRb (Barra lateral 8.4). Soros anti-LT coletados de camundongos e hamsters com tumores induzidos por SV40 foram utilizados no ano de 1979 para analisar as proteínas presentes em células transformadas com SV40. Os imunoprecipitados resultantes continham tanto LT como uma proteína associada, que exibia uma massa molecular aparente de 53 a 54 kDa (Figura 9.2). O anti-soro reativo com a proteína p53 foi obtido para detectá-la em células de carcinoma embrionário murino, e, mais tarde, em uma variedade de células tumorais de roedores e de humanos que nunca haviam sido infectadas por SV40. Entretanto, anticorpos monoclonais que reconheceram somente LT imunoprecipitaram a proteína de 53 a 54 kDa em células infectadas pelo vírus, mas não em células não-infectadas.

Figura 9.2 A descoberta de p53 Fibroblastos de camundongos BALB/c 3T3 normais (3T3) transformados por SV40 e células de carcinoma embrionário (EC) de camundongos F9 foram expostas a metionina-³⁵S, sendo que os lisados resultantes foram incubados com soro de hamster normal (N) e antisoro reativo de hamster contendo células de hamster transformadas com SV40 (T). O soro anti-tumor imunoprecipitou uma proteína de 94 kDa a partir de células 3T3 infectadas, porém não a partir de células 3T3 não-infectadas. Em adição, uma segunda proteína que migrou um pouco a frente do marcador de 54 kDa foi imunoprecipitada a partir de células 3T3 transformadas com SV40, mas não em células 3T3 normais. Além disso, essa mesma proteína poderia ser imunoprecipitada a partir de células F9, tendo estas sido ou não expostas ao SV40 (seta). (Estes dados, em particular, não provam uma associação física de LT [proteína de 94 kDa] com p53, mas demonstram que p53 foi uma proteína celular que esteve presente em elevadas quantidades em dois tipos de células transformadas.) (D.I. Linzer e A.J. Levine, *Cell* 17:43-52, 1979.)



Juntas, essas observações indicam que a proteína LT expressa em células transformadas com SV40 estava fortemente ligada a uma nova proteína, a qual veio se chamar p53. O anti-soro, que reagiu com ambos, LT e p53, detectou p53 em determinadas células não-infectadas, notavelmente, células tumorais que foram transformadas por mecanismos não-virais, como as células de carcinoma embrionário (EC) F9 analisadas na Figura 9.2. As últimas observações indicaram que p53 era de origem celular em vez de viral, uma conclusão reforçada por um trabalho descrito no mesmo ano, em que células murinas transformadas por meio de exposição a um agente químico carcinogênico também expressaram p53.

Essas linhas de evidências sugerem que a oncoproteína LT atua, ao menos em parte, escolhendo proteínas celulares do hospedeiro para ligação. (A descoberta de que o antígeno “large T” também é hábil em se ligar a pRb, proteína do retinoblastoma, já data de sete anos). Nos anos que se passaram desde as descobertas de 1979, foi observado que uma variedade de outros vírus de DNA e, pelo menos um, de RNA possuem oncoproteínas específicas que se associam a p53 ou que perturbam sua função (Tabela 9.1). (Como discutiremos mais adiante neste capítulo, e como se torna aparente a partir da Tabela 9.1, esses vírus também têm como alvo pRb e se comprometem em bloquear a apoptose.)

Tabela 9.1 Vírus de tumores que perturbam pRb, p53 e/ou a função apoptótica

Vírus	Proteína viral que tem como alvo pRb	Proteína viral que tem como alvo p53	Proteína viral que tem como alvo apoptose
SV40	large T (LT)	large T (LT)	
Adenovírus	E1A	E1B55K	E1B19K ^a
HPV	E7	E6	
Poliomavírus	large T	large T ?	middle T (MT) ^b
Herpesvírus saimiri	Ciclina V ^c		v-Bcl-2 ^d
HHV-8 (KSHV)	Ciclina K ^c	LANA-2	v-Bcl-2, ^d v-FLIP ^e
HCMV	IE72 ^f	IE86	vICA, ^g pUL37 ^h
HTLV-1	Tax ⁱ		
Epstein-Barr		EBNA-1 ^j	LMP1 ^j

^a Funções como as de Bcl-2 para bloquear a apoptose.
^b Ativa PI3K e, então, Akt/PKB.
^c Relacionada a ciclina tipo D.
^d Relacionada à proteína celular antiapoptótica Bcl-2.
^e Proteína inibidora da caspase-8 viral (FLICE); bloqueia uma etapa inicial na cascata apoptótica extrínseca.
^f Interage e inibe p107 e, possivelmente, p130; pode também ter como alvo pRb, para degradação em proteassomos.
^g Liga-se e inibe procaspase-8.
^h Inibe a via apoptótica a partir da caspase-8 e antes da liberação de citocromo c.
ⁱ Induz a síntese de ciclina D2 e se liga e inativa p16^{INK4A}.
^j LMP1 facilita a ativação de p52 NF-κB e, dessa forma, induz a expressão de Bcl-2; EBNA-1 atua por meio de uma proteína celular, USP7/HAUSP, para reduzir os níveis de p53.

9.2 A descoberta de *p53* como um gene supressor de tumor

A transfecção de um clone de cDNA de *p53* em fibroblastos de embrião de rato (REFs) revelou que esse DNA poderia colaborar com o oncogene *ras*, o qual foi co-transfectado nestas células de roedores. Tal atividade sugeriu que o gene *p53* (o qual algumas vezes é denominado *Trp53* em camundongos e *TP53* em humanos) pode atuar como um oncogene, similar ao oncogene *myc*, o qual foi descrito ser capaz de colaborar com o oncogene *ras* na transformação de células de roedores (veja a Seção 11.10). Assim como *myc*, o cDNA de *p53* introduzido pareceu contribuir para evidentes sinais indutores de crescimento que acabaram resultando na transformação celular na presença de um oncogene concomitantemente expresso, *ras*.

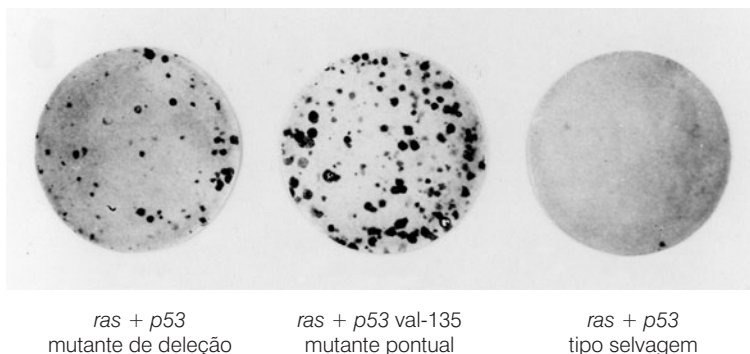
Porém, as aparências enganaram. Como se tornou evidente mais tarde, esse cDNA de *p53* foi originalmente sintetizado utilizando o mRNA extraído a partir de células tumorais como molde. A subsequente manipulação de um cDNA de *p53* clonado em lugar de um mRNA de células normais revelou que esse clone de cDNA, em vez de favorecer a transformação celular, na verdade suprimiu este processo (Figura 9.3). A comparação das seqüências dos dois cDNAs revelou que ambos diferem por uma única substituição de base, uma mutação pontual, que causou uma substituição de um aminoácido na proteína *p53*. Como conseqüência, o clone utilizado inicialmente codificava uma proteína *p53* mutante com uma função alterada.

Esses resultados indicaram que o alelo tipo selvagem de *p53* realmente atua na supressão da proliferação celular, e que *p53* adquire funções para o estímulo do crescimento celular somente quando apresenta uma mutação pontual em sua fase de leitura. Por meio dessa descoberta, o gene *p53* foi finalmente classificado como um gene supressor de tumor.

No ano de 1987, tornou-se evidente que tais alelos *p53* com mutações pontuais são comuns nos genomas de uma ampla variedade de células tumorais humanas. Dados pesquisados até o ano de 2002 indicaram que o gene *p53* está mutado em 30 a 50% dos cânceres humanos que ocorrem com mais freqüência (Figura 9.4). Além disso, dentre todos os genes examinados em genomas de células cancerosas humanas, *p53* é o gene mais freqüentemente encontrado com mutações, estando presente na forma mutante nos genomas de quase metade de todos os tumores humanos.

Entretanto, análises funcionais adicionais do *p53*, realizadas posteriormente, tornaram claro que *p53* não é um gene supressor de tumor típico. No caso da maioria dos genes supressores de tumor, quando o gene é inativado (i. e., por nocaute) homozigoticamente na linhagem germinativa de um camundongo (utilizando a estratégia da inativação do gene-alvo descrita na Barra lateral 7.10), o resultado foi, quase que invariavelmente, um bloqueio no desenvolvimento embrionário devido à morfogênese desregulada em um ou mais tecidos. Esses genes supressores de tumor parecem atuar como reguladores negativos de proliferação em uma variedade de tipos celulares; sua deleção dos circuitos regulatórios das células leva, conseqüentemente, à proliferação inapropriada de algumas delas e, assim, ao rompimento do desenvolvimento normal.

Figura 9.3 Efeitos de *p53* na transformação celular Um cDNA codificante para um oncogene *ras* foi co-transfectado com diversas formas alternativas de cDNA de *p53* em fibroblastos de embrião de rato (REFs). Na presença de um vetor *p53 dl* mutante, o qual contém uma deleção quase completa da fase de leitura de *p53* (esquerda), um pequeno número de focos foi formado. Na presença de um mutante *p53* pontual (centro), ocorreu a formação de um grande número de focos. Entretanto, na presença de um clone de cDNA *p53* tipo selvagem (direita), nenhum foco formou-se. (De D. Eliyahu *et al.*, *Nature* 312:646-649, 1984.)



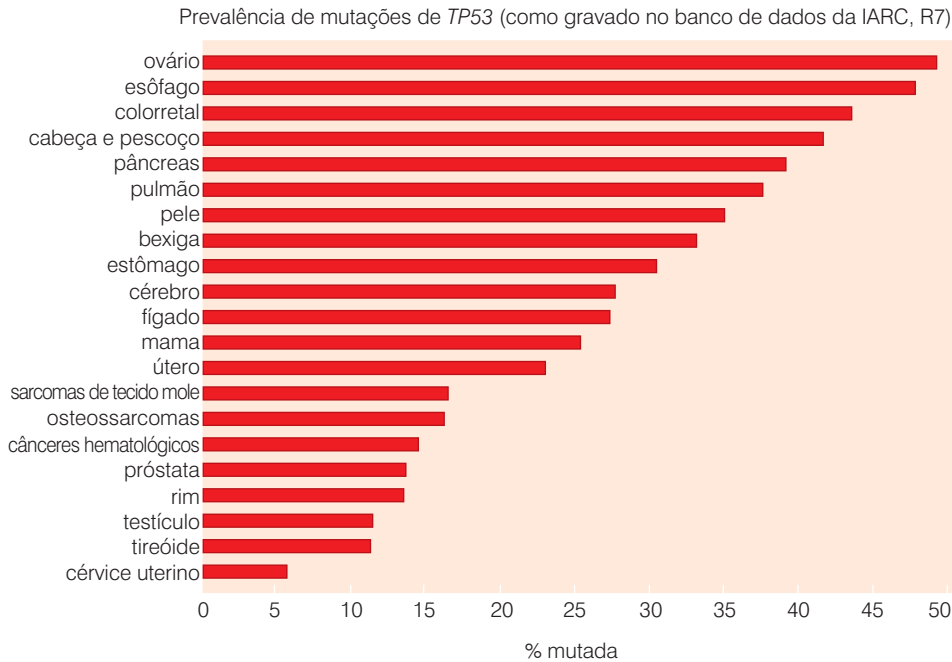


Figura 9.4 Frequência de alelos *p53* mutantes em genomas de células tumorais humanas. Como indicado neste gráfico de barras, os alelos *p53* mutantes são freqüentemente encontrados nos tumores humanos mais comuns. Este conjunto de dados inclui 17.689 mutações somáticas de *p53* e 225 mutações de linhagem germinativa que foram relatadas até junho de 2002. As barras indicam a percentagem de cada tipo de tumor que contém um alelo *p53* mutante. (A partir de International Agency for Research on Cancer, TP53 genetic variations in human cancer, IARC, R7, 2002.)

Em total contraste, a deleção de ambas as cópias do gene *p53* da linhagem germinativa de camundongo não possui efeito evidente no desenvolvimento da grande maioria de embriões *p53*^{-/-}. Além disso, *p53* poderia não ser considerado como um simples regulador negativo de proliferação celular durante o desenvolvimento normal. Portanto, *p53* foi claramente um gene supressor de tumor, desde que camundongos sem ambas as cópias de *p53* da linhagem germinativa tiveram um curto tempo de vida (em torno de cinco meses), morrendo, mais freqüentemente, devido a linfomas e sarcomas (Figura 9.5). Esse comportamento forneceu os primeiros indícios de que a proteína *p53* não atua para transduzir sinais proliferativos e anti-proliferativos que continuamente incidem sobre as células e regulam sua proliferação. Em vez disso, *p53* pareceu ser especializado em prevenir o aparecimento de células anormais, especificamente aquelas células que são capazes de gerar tumores.

9.3 Versões mutantes de *p53* interferem na função normal da proteína

As observações de freqüentes mutações do gene *p53* em genomas de células tumorais sugerem que muitas células cancerosas incipientes devem perturbar ou eliminar a função

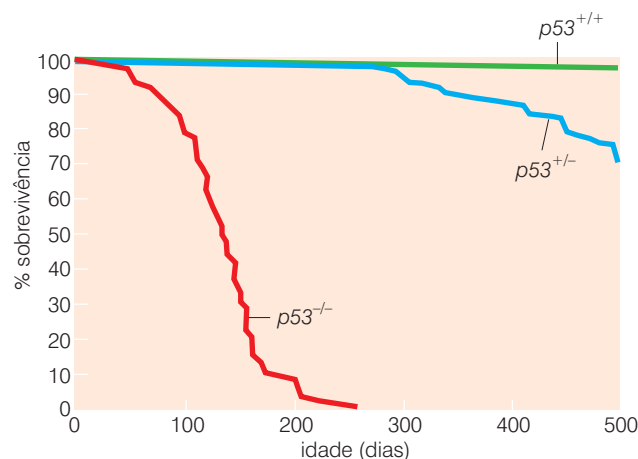


Figura 9.5 Efeitos de alelos *p53* mutantes na linhagem germinativa de camundongo. Este gráfico de Kaplan-Meier indica o percentual de camundongos do fenótipo indicado que têm sobrevivido (ordenada) em função do tempo de vida decorrido em dias (abscissa). Enquanto a ausência da função de *p53* em ratos *p53*^{-/-} tem pouco efeito em seu desenvolvimento embrionário e viabilidade ao nascimento, ela resultou em uma alta taxa de mortalidade relativamente cedo em relação ao tempo de vida, derivando muito do desenvolvimento de tumores como sarcomas e leucemias. Todos os homozigotos *p53*^{-/-} sucumbiram às malignidades em torno de 250 dias de vida (linha vermelha), e mesmo heterozigotos *p53*^{+/-} (linha azul) começaram a desenvolver tumores nesse período, enquanto animais com o tipo selvagem (*p53*^{+/+}) (linha verde) mostraram praticamente nenhuma mortalidade até quase 500 dias de vida. (Adaptada de T. Jacks et al., *Curr. Biol.* 4:1-7, 1994.)

de p53 antes de proliferarem. Isso levantou a questão de com qual precisão essas células atuam para bloquear a função de p53. Nesse ponto, surge uma outra anomalia, pois o gene *p53* não parece obedecer ao esquema de Knudson para a eliminação dupla de genes supressores de tumor. Por exemplo, a descoberta de que um clone de cDNA codificante para uma versão mutante de p53 era capaz de alterar o comportamento de fibroblastos de embrião de rato do tipo selvagem (como descrito anteriormente) vai diretamente contra o modelo de Knudson de como genes supressores de tumor deveriam atuar (Seção 7.3).

De acordo com o esquema de Knudson, uma célula pré-maligna que está em evolução pode somente obter benefício substancial uma vez que tenha perdido ambas as cópias funcionais de um gene supressor de tumor que tem retardado sua proliferação. No modelo Knudson, tais inativações genéticas são causadas por mutações que criam alelos inativos (nulos) e, assim, recessivos. Portanto, uma célula pré-maligna pode se beneficiar minimamente da inativação de uma cópia de um gene supressor de tumor – devido à redução da função efetiva do gene – ou não, caso a atividade residual especificada pela cópia do tipo selvagem seja suficiente para mediar a função normal. Como verificamos no Capítulo 7, a mudança substancial no fenótipo celular ocorre normalmente apenas quando a função de um gene supressor é eliminada por meio de duas mutações inativadoras sucessivas ou por meio de uma combinação de uma mutação inativadora com um evento de perda de heterozigosidade (LOH) (Seção 7.4).

Foi difícil conciliar o modelo de Knudson com o comportamento observado do cDNA de *p53* mutante introduzido em fibroblastos de embrião de rato. Os cDNAs de *p53* mutantes claramente alteraram o fenótipo celular, mesmo essas células tendo mantido seu próprio par de cópias do gene *p53* tipo selvagem. Isso significou que o cDNA de *p53* mutante introduzido poderia não estar funcionando como um alelo inativo, recessivo. Em vez disso, pareceu que o alelo *p53* com mutação pontual estava exercendo ativamente algum tipo de função *dominante* quando introduzido nessas células de embrião de rato.

Outro indício vem da análise da sequência de alelos *p53* mutantes em diversos genomas de células tumorais humanas. Essas análises indicaram que a grande maioria dos alelos *p53* mutantes associados a tumores apresenta mutações pontuais em suas fases de leitura que criam códons **errados** (*missense*, em inglês) (resultando em substituições de aminoácidos) em vez de códons **sem sentido** (*nonsense*, em inglês) (que causam terminação prematura da cadeia polipeptídica em crescimento). Assim, mais de 15 mil alelos *p53* associados a tumores têm sido seqüenciados a partir de genomas de células tumorais humanas, dos quais 75% têm apresentado tais mutações erradas (Figura 9.6). Além disso, deleções de seqüências dentro da fase de leitura do gene *p53* são relativamente incomuns. Como consequência, pesquisadores chegam à conclusão de que as células tumorais podem se beneficiar da presença de uma proteína p53 sutilmente alterada em vez da sua ausência completa, como ocorreria seguindo a criação de **alelos nulos** por meio de mutações sem sentido ou a partir de deleções de porções significativas do gene *p53*.

A solução do “quebra-cabeça” de como a proteína p53 mutante pode promover a formação de células tumorais surgiu de duas linhas de pesquisa. Primeiro, estudos na área de genética de leveduras indicaram que alelos mutantes de alguns genes podem ser encontrados, nos quais a mutação responsável inativa o funcionamento normal do produto gênico codificado. Ao mesmo tempo, essa mutação confere, ao alelo mutante, a habilidade de interferir nas atividades da cópia tipo selvagem desse gene na célula ou de obstruí-las. Alelos desse tipo são denominados *dominante-interferentes* ou *dominante-negativos*.

Um segundo indício vem de análises bioquímicas da proteína p53, as quais revelaram que p53 era uma proteína nuclear que normalmente existia na célula como um **homotetrâmero**, isto é, uma estrutura de quatro subunidades polipeptídicas idênticas (Figura 9.7A). Em conjunto com o conceito de dominante-negativo, a observação da estrutura tetramérica sugeriu um mecanismo pelo qual um alelo *p53* mutante poderia interferir ativamente no funcionamento de um alelo *p53* tipo selvagem sendo expresso na mesma célula.

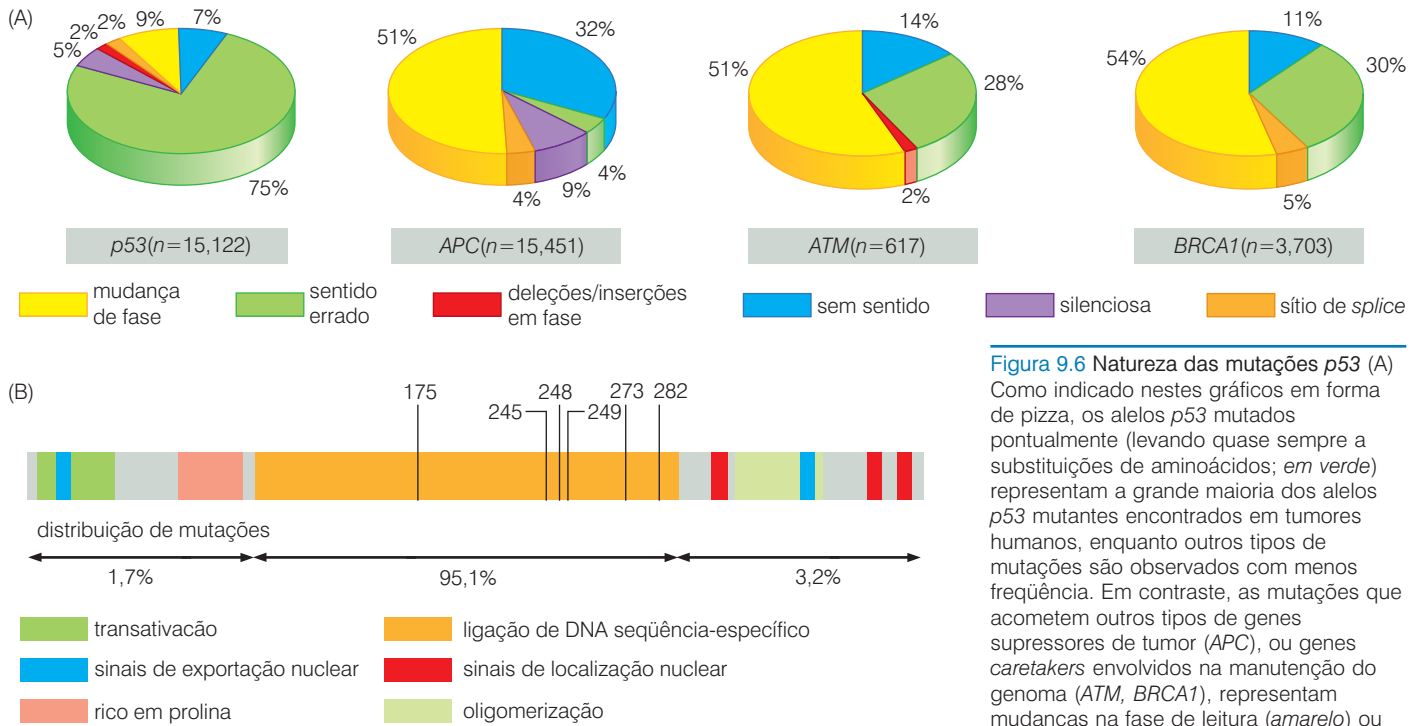


Figura 9.6 Natureza das mutações p53 (A) Como indicado nestes gráficos em forma de pizza, os alelos p53 mutados pontualmente (levando quase sempre a substituições de aminoácidos; em verde) representam a grande maioria dos alelos p53 mutantes encontrados em tumores humanos, enquanto outros tipos de mutações são observados com menos frequência. Em contraste, as mutações que acometem outros tipos de genes supressores de tumor (APC), ou genes caretakers envolvidos na manutenção do genoma (ATM, BRCA1), representam mudanças na fase de leitura (amarelo) ou códons sem sentido (azul) na maioria dos casos, ambos os quais modificam a estrutura, geralmente por meio da criação de versões truncadas de proteínas; tais formas defectivas dessas proteínas são, várias vezes, degradadas rapidamente nas células. (B) Mais de 15 mil alelos p53 mutantes têm sido sequenciados em tumores humanos, dos quais a maioria são mutações pontuais. As localizações dessas mutações que se encontram dentro da fase de leitura de p53 são demonstradas aqui. Como pode se verificar, a grande maioria das mutações de p53 (95,1%) afeta o domínio de ligação ao DNA da proteína p53. Os números acima na figura indicam o número do resíduo de aminoácido. (A, de A. I. Robles *et al.*, *Oncogene* 21:6898-6907, 2002; B, de K.H. Vousden e X. Lu, *Nat. Rev. Cancer* 2:594-604, 2002.)

Um alelo p53 mutante encontrado em uma célula humana cancerosa codifica uma forma de proteína p53 que possui a maioria da função normal perdida, porém conserva a sua habilidade em participar na formação do tetrâmero. Se tal alelo mutante estivesse coexistindo com um alelo tipo selvagem nessa célula, os tetrâmeros p53 formados poderiam conter misturas de proteínas p53 mutadas e tipo selvagem em diversas proporções. A presença de somente uma proteína p53 mutante em um tetrâmero pode interferir no funcionamento deste como um todo. A Figura 9.7B ilustra o fato de que 15 das 16 combinações igualmente possíveis de monômeros p53 tipo selvagem e mutantes poderiam conter, no mínimo, uma subunidade p53 mutante e que poderiam, além disso, perder alguma ou toda a atividade relacionada a um tetrâmero p53 completamente tipo selvagem. Como consequência, somente 1/16 dos tetrâmeros p53 formados nessas células heterozigotas (as quais apresentam uma cópia do gene p53 mutado e uma cópia selvagem) poderiam ser exclusivamente compostos de subunidades p53 tipo selvagem e manter sua função do tipo selvagem completa.

Em uma situação experimental na qual um clone de cDNA mutante de p53 é introduzido por meio de transferência genética (transfecção) em células que possuem um par de alelos p53 tipo selvagem, a expressão desse alelo introduzido é geralmente direcionada por um promotor transcricional altamente ativo, promotor este que é muito mais ativo do que aquele que controla a expressão das cópias do gene p53 nativo na célula. Como consequência, em tais células transfectadas, a quantidade de proteína p53 mutante expressa pelo gene introduzido será muito maior do que a quantidade de proteína normal produzida pelas cópias endógenas do gene p53 tipo selvagem da célula. Portanto, muito menos do que 1/16 dos tetrâmeros p53 em tais células serão exclusivamente formados a partir de subunidades p53 tipo selvagem. Isso explica como um alelo p53 mutante introduzido pode ser altamente efetivo em comprometer virtualmente toda a função de p53 em tais células.

A lógica descrita anteriormente pode sugerir que muitas células humanas tumorais, as quais parecem obter alguma vantagem por meio da perda da função de p53, deveriam possuir um alelo p53 tipo selvagem e um mutante. Na verdade, na grande maioria das células humanas tumorais que são mutantes no loco p53, esse loco tem sofrido a perda de heterozigidade (LOH), na qual o alelo tipo selvagem tem sido descartado, produzindo uma célula com dois alelos p53

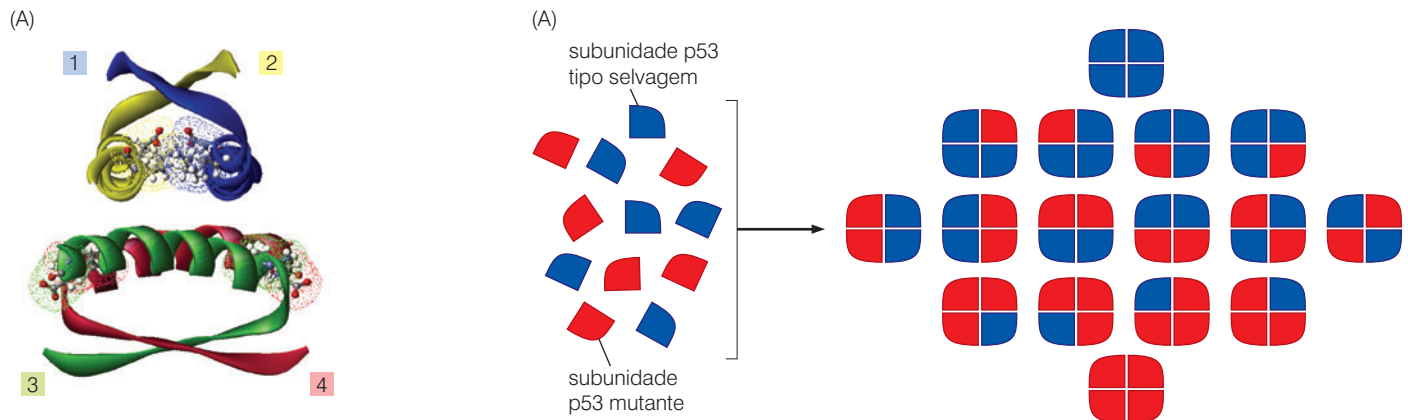


Figura 9.7 Mecanismo de mutações do dominante-negativo de *p53* (A) O domínio de tetramerização de *p53*, composto de uma hélice α , é demonstrado aqui por meio do uso de cristalografia por difração de raios X. Esse domínio geralmente permanece intacto nas proteínas *p53* mutantes encontradas em células tumorais, possibilitando-lhes formar tetrâmeros com outras proteínas *p53* mutantes ou com moléculas *p53* do tipo selvagem. Esse domínio também permite a *p53* formar tetrâmeros misturados com proteínas relacionadas; e uma substituição de aminoácido no final da hélice, a qual desestabiliza os tetrâmeros, é responsável por uma predisposição a um tumor familiar raro (Barra lateral 9.5). Os quatro domínios de hélice ilustrados aqui, cada um em cor diferente, são montados em dois pares, sendo que os pares são montados em ângulos retos um com o outro. (B) A proteína *p53* normalmente atua como um fator de transcrição homotetramérico. Entretanto, em células que carregam um único alelo *p53* mutante, que codifica uma proteína estruturalmente modificada, a proteína mutante pode manter sua habilidade em formar tetrâmeros, porém pode perder sua habilidade em exercer a função normal de *p53*. Consequentemente, tetrâmeros misturados, compostos de diferentes proporções de subunidades de *p53* tipo selvagem (azul) e mutantes (vermelho) podem ser formados, e mesmo a presença de uma única subunidade protéica mutante pode comprometer o funcionamento do tetrâmero inteiro. Portanto, em uma célula que é heterozigota no loco *p53*, 15/16 das subunidades podem perder completamente a função normal. (A, de E. L. DiGiammarino *et al.*, *Nat. Struct. Biol.* 9:12-16, 2002.)

mutantes. Assim, nessa célula, uma cópia do gene *p53* é inicialmente mutada, o que é seguido pela eliminação da cópia tipo selvagem sobrevivente alcançada por meio de algum tipo de mecanismo de perda de heterozigiosidade.

Está claro que em uma mutação inicial que resulte em um mutante, o alelo dominante negativo (dn) será o mais utilizado pela célula tumoral incipiente do que um que resulte em um alelo nulo, que causa perda total de uma proteína *p53* codificada. O alelo dominante negativo pode causar a perda de 15/16 da função de *p53*, enquanto o alelo nulo resultará, no máximo, na perda de metade da função de *p53*. (Na verdade, se os níveis da proteína *p53* são cuidadosamente regulados na célula, como devem ser, então o alelo nulo não causará nenhum efeito qualquer que seja a concentração total de *p53* na célula, pois o alelo tipo selvagem compensará por meio da produção de mais proteína tipo selvagem.)

Então, por que a eliminação do alelo *p53* tipo selvagem é mesmo necessária? A resposta parece estar no 1/16 da função completamente normal do gene *p53*; mesmo essa pouca quantia parece ser mais do que as células tumorais necessitam para viver. Assim, sendo mais oportunistas, elas lançam mão do alelo *p53* tipo selvagem remanescente a fim de proliferarem melhor. A observação de células-tronco embrionárias geneticamente modificadas fornece diversas evidências para o modo de ação do dominante-negativo de *p53* (Barra lateral 9.1).

9.4 Moléculas de proteína *p53* geralmente têm meia-vida curta

A localização nuclear da proteína *p53* em muitas células normais e neoplásicas sugeriu que essa proteína possa atuar como um fator de transcrição (TF). No mínimo três mecanismos foram determinados na regulação da atividade de fatores de transcrição. (1) Os níveis do fator de transcrição no núcleo são modulados. (2) Os níveis de um fator de transcrição no núcleo são mantidos constantes, porém a atividade intrínseca do fator é impulsionada por algum tipo de modificação covalente. (3) Os níveis de alguns fatores de transcrição que colaboram entre si podem ser modulados. Em alguns casos, todos os três mecanismos cooperam. No caso de *p53*, o primeiro mecanismo – mudanças no nível da proteína *p53* – esteve inicialmente implicado. A medida dos níveis de proteína *p53* indicou que eles poderiam variar drasticamente de um tipo celular para outro e, de maneira provocativa, aumentariam rapidamente quando as células fossem expostas a certos tipos de estresse fisiológico.

Essas observações levantaram a questão de como os níveis da proteína *p53* são modulados pela célula. Muitas moléculas protéicas celulares, uma vez sintetizadas, persistem por dezenas ou mesmo centenas de horas. (Algumas proteínas celulares, como aquelas que formam as subunidades ribossomais em células com crescimento exponencial, parecem persistir por muitos dias.) Ainda outras proteínas celulares são muito instáveis metabolicamente e são degradadas tão logo sintetiza-

Barra lateral 9.1 Células-tronco embrionárias mutantes demonstram a ação dominante negativa de alelos *p53* mutantes A maioria das evidências de que alelos *p53* mutantes atuam de uma forma dominante negativa vem a partir de manipulação genética de células-tronco embrionárias (ES), nas quais mutações pontuais têm sido introduzidas nas cópias endógenas do gene *p53* por meio de uma técnica de recombinação homóloga (veja a Barra lateral 7.10). Em tal experimento, duas mudanças alternativas de um nucleotídeo apenas, que causam substituições de aminoácido no domínio de ligação ao DNA de *p53*, foram introduzidas no genoma de dois conjuntos dessas células; essas substituições indicam dois alelos mutan-

tes freqüentemente encontrados em genomas tumorais humanos. Em ambos os casos, os alelos mutantes estiveram presentes em uma configuração heterozigota.

Essas células mutantes demonstraram reduções substanciais na função de *p53*. Em contraste, outras células ES que não possuem uma das duas cópias do gene *p53* (i. e., carregando um alelo nulo de *p53*) responderam quase como células tipo selvagem a determinados estímulos fisiológicos que dependem da função de *p53*. Evidências como essas proporcionam um peso maior ao argumento de que muitas versões mutantes de *p53* são capazes de interferir ativamente nas funções da proteína tipo selvagem co-expressa.

das. Uma maneira de distinguir dentre essas alternativas é tratar as células com cicloeximida, uma droga que bloqueia a síntese proteica. Quando tal experimento foi realizado em células com alelos *p53* tipo selvagem, a proteína *p53* desapareceu com uma meia-vida de apenas 20 minutos. Isso levou à conclusão de que *p53* em geral é uma proteína altamente instável, sendo degradada por meio de proteólise logo após sua síntese.

Esse padrão de síntese seguido pela rápida degradação pode parecer ser um “ciclo inútil”, o qual seria altamente desperdiçador para a célula. Por que uma célula deveria investir energia substancial e capacidade sintética para produzir uma molécula de proteína somente para destruí-la tão logo tenha sido sintetizada? Comportamentos semelhantes têm sido associados a outras proteínas celulares, como Myc (Seção 6.1).

A base de raciocínio desse esquema ostensivo e desperdiçador de reciclagem rápida da proteína é simples: uma célula pode necessitar que o nível de uma proteína seja rapidamente aumentado ou diminuído em resposta a determinados sinais fisiológicos. Em princípio, tal modulação poderia ser alcançada por meio da regulação do nível de seu mRNA ou da taxa com o qual esse mRNA está sendo traduzido. Entretanto, modificações mais rápidas nos níveis de uma proteína crítica podem simplesmente ser alcançadas pela estabilização ou desestabilização desta proteína. Por exemplo, no caso de *p53*, uma célula pode duplicar a concentração desta proteína em 20 minutos simplesmente bloqueando sua degradação.

Sob condições normais, uma célula sintetizará continuamente moléculas *p53* em uma alta taxa e rapidamente irá degradá-la de forma igual. Isso resulta num nível de “estado estacionário” muito baixo da proteína dentro desta célula. Em resposta a determinados sinais fisiológicos, entretanto, a degradação de *p53* é bloqueada, resultando num rápido aumento dos níveis dessa proteína na célula. Esta observação leva a questões adicionais de porque uma célula normal desejaria níveis de *p53* rapidamente modulados, e quais tipos de sinais fariam uma célula cessar a degradação de *p53*, resultando em níveis rapidamente aumentados desta proteína.

9.5 Uma variedade de sinais causa a indução de *p53*

Durante o início dos anos 1990, descobriu-se que vários agentes eram capazes de induzir rápido aumento nos níveis da proteína *p53*. Estes incluíam raios X, radiação ultravioleta (UV), certas drogas quimioterápicas que danificam DNA, inibidores da síntese de DNA e agentes que destroem componentes dos microtúbulos do citoesqueleto. Após alguns minutos da exposição de células a alguns desses agentes, a proteína *p53* foi prontamente detectada em quantidades substanciais em células que previamente demonstraram níveis mínimos dela. Essa rápida indução ocorreu na ausência de quaisquer modificações nos níveis de mRNA de *p53* e comprovou que isso não ocorreu devido ao aumento da transcrição do seu gene. Em vez disso, logo se torna evidente que os níveis elevados da proteína resultaram inteiramente da estabilização pós-traducional da proteína *p53* normalmente lábil.

Nos anos que se seguiram, foi observado que uma diversidade maior de sinais fisiológicos celulares era capaz de induzir o aumento nos níveis de *p53*. Dentre estes estava a baixa tensão

de oxigênio (hipoxia), a qual ocorre tanto em células normais quanto malignas, que não têm acesso adequado à circulação e, assim, ao oxigênio carregado pelo sangue. Ainda mais tarde, a introdução do oncogene *myc* ou do *E1A* de adenovírus (Seções 8.5 e 8.9) dentro de células também foi capaz de causar aumento nos níveis de p53.

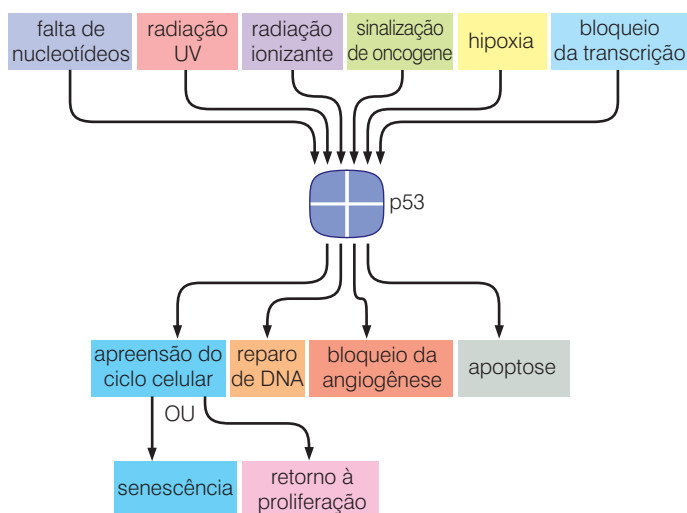
No momento, a lista de estímulos que provocam aumento nos níveis de p53 tem crescido bastante. A expressão de níveis mais altos do que os normais do fator de transcrição E2F1, a ampla demetilação de DNA cromossomal e um déficit de nucleotídeos precursores de DNA desencadeiam o acúmulo de p53. A exposição de células ao óxido nítrico ou a um meio de crescimento acidificado, a depleção do *pool* intracelular de ribonucleotídeos e o bloqueio da síntese de RNA ou DNA também aumentam os níveis de p53.

Essas observações deixam claro que diversos arranjos de sensores são responsáveis pelo monitoramento da integridade e do funcionamento de vários sistemas celulares. Quando esses sensores detectam um dano ou mau funcionamento, eles enviam sinais à p53 e seus reguladores, resultando em um rápido aumento dos níveis de p53 dentro de uma célula (Figura 9.8).

Já era sabido, a partir de outros trabalhos, que os mesmos agentes **genotóxicos** (i. e., que causam danos ao DNA) e sinais fisiológicos que provocam o aumento de p53 atuavam sob certas condições de uma maneira **citostática**, forçando as células a parar seu avanço pelo ciclo celular, uma resposta várias vezes chamada “apreensão do crescimento”. Em outras situações, alguns desses sinais podem desencadear ativação do programa apoptótico (suicídio celular). Essas observações, quando analisadas em conjunto, mostram um paralelo impressionante: agentes tóxicos que induziram a apreensão do crescimento ou apoptose foram também capazes de induzir aumento dos níveis de p53. Pelo motivo de que tais observações foram inicialmente somente correlações, elas dificilmente provaram que p53 estava envolvida, de alguma maneira, em fazer com que as células entrassem em apreensão de crescimento ou apoptose após a exposição a estímulos tóxicos ou de estresse.

As demonstrações definitivas de casualidade vêm de investigações detalhadas das funções de p53. Por exemplo, quando agentes genotóxicos, tais como raios X, provocaram um aumento nos níveis celulares de p53, os níveis da proteína p21^{Cip1} (Seção 8.4) aumentaram subsequentemente; essa indução esteve ausente em células expressando a proteína p53 mutante. Isso sugeriu que p53 poderia parar o avanço do ciclo celular induzindo a expressão desse inibidor de CDK amplamente atuante (Figura 9.9). Certamente, as respostas biológicas de longo prazo à irradiação foram várias vezes afetadas pelo estado do gene *p53* da célula. Assim, células que apresentavam alelos *p53* mutantes mostraram uma baixa tendência a entrar em apreensão de crescimento e apoptose quando comparadas com células tipo selvagem que foram expostas em paralelo a esse agente (Figura 9.10).

Figura 9.8 Sinais ativadores de p53 e os efeitos *upstream* desta. Estudos da função de p53 têm revelado que uma variedade de situações de estresse celular fisiológico pode causar um rápido aumento nos níveis dessa proteína. A proteína p53 resultante acumulada sofre, então, algumas modificações pós-traducionais (a serem discutidas posteriormente) e passa a induzir um número de respostas. Uma resposta citostática (“apreensão do ciclo celular”, várias vezes chamada “apreensão de crescimento”) pode ser tanto irreversível (“senescência”) como reversível (“retorno à proliferação”). Proteínas de reparo de DNA podem ser mobilizadas tanto quanto proteínas que antagonizam a formação de vasos sanguíneos (“bloqueio da angiogênese”). Como uma alternativa, em determinadas circunstâncias, p53 pode desencadear apoptose.



Juntas, essas várias observações poderiam ser incorporadas em um simples modelo mecânico unificado: p53 recebe continuamente sinais de diversos arranjos de sistemas de sobrevivência. Se p53 recebe sinais de alarme específico desses monitores, ela induz a parada da proliferação celular ou desencadeia o programa suicida apoptótico (veja a Figura 9.8).

De fato, esses poderes citostáticos e pró-apoptóticos de p53 representam o principal tratamento para células cancerígenas incipientes que avançam para o estado de crescimento maligno. Inúmeras situações de estresse, incluindo hipoxia, dano genômico e desequilíbrios nas vias de sinalização que controlam a proliferação celular, são comumente vivenciadas por células cancerígenas durante muitos estágios do desenvolvimento tumoral. Na presença de qualquer uma dessas situações, um intacto sistema de alarme funcional de p53 ameaça a viabilidade de células que seriam cancerígenas. Conseqüentemente, a atividade de p53 deve ser bloqueada ou mesmo completamente eliminada nessas células caso elas sobrevivam e prosperem.

Isso explica por que a maioria, e talvez todas, das células humanas tumorais apresenta sua resposta de alarme de p53 parcial ou totalmente inativada. Sem p53 funcional, as células cancerígenas são capazes de tolerar hipoxia, danos extensos a seus genomas e profunda desregulação de seu circuito controlador de crescimento. Uma vez que uma célula adquira resistência a esses fatores normalmente debilitantes, a estrada está pronta para ela e suas descendentes continuarem a caminhada para um estado de crescimento altamente maligno. Do mesmo modo, células normais também devem evitar atividade excessiva de p53, já que isso ameaça suas vidas e, desse modo, causa depleção das células necessárias à manutenção das funções normais do corpo.

9.6 Danos ao DNA e sinais de crescimento desregulados causam estabilização de p53

Foi observado que três sistemas de monitoramento, bem estudados, enviam sinais à p53 no evento que eles detectam dano ou sinais de desequilíbrio. O primeiro desses sistemas responde a quebras de duplas-fitas (ds) no DNA cromossomal, notavelmente aquelas que são criadas por meio de radiação ionizante, tais como raios X. Certamente, uma única quebra de dsDNA ocorrendo em qualquer lugar no genoma parece suficiente para induzir um aumento mensurável nos níveis de p53. Enquanto as identidades das proteínas que detectam tais quebras permanecem desconhecidas, sabe-se que elas transferem sinais para a ATM cinase. (Como descrito posteriormente no Capítulo 12, a deficiência de ATM leva à doença de ataxia telangiectasia e à hipersensibilidade das células à irradiação X.) ATM, por sua vez, transfere seus sinais para a ATR cinase (relacionada à ATM), a qual é capaz de fosforilar p53 sozinha; a ATM também parece ser capaz de fosforilar diretamente p53. Essa fosforilação de p53 a protege da destruição.

Uma segunda via de sinalização é ativada por uma ampla variedade de agentes que danificam o DNA, incluindo algumas drogas quimioterápicas e radiação UV; certos inibidores de cinases protéicas também estimulam essa via. Isso depende da ATR cinase (ver anteriormente) encaminhar sinais à caseína cinase II (CKII), a qual, por sua vez, fosforila p53.

Uma terceira via que leva à ativação de p53 é desencadeada por sinais aberrantes de crescimento, notavelmente aqueles que resultam na desregulação da via de controle do ciclo celular pRb-E2F.

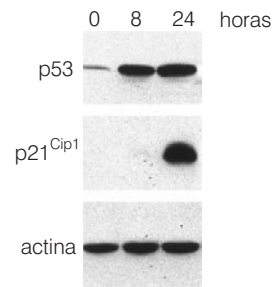
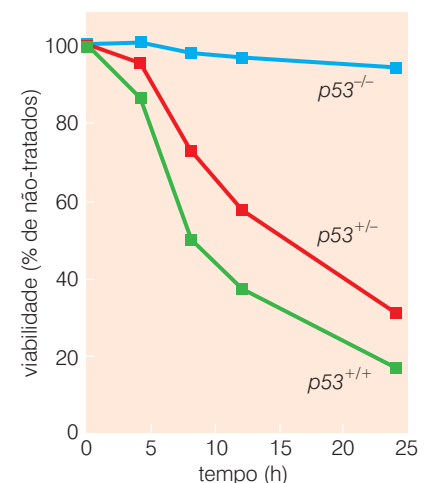


Figura 9.9 Indução de p53 e p21^{Cip1} após o dano ao DNA A exposição de células a raios X serve para aumentar fortemente os níveis de p53. Uma vez presente em altas concentrações (8, 24 horas) e funcionalmente ativada (*não mensurado aqui*), a proteína p53 induz a expressão da proteína p21^{Cip1} (Seção 8.4). Esta, por sua vez, atua como um potente inibidor de CDK dos complexos ciclina-CDK que são ativados nas fases G1 (final), S, G2 e M e pode ainda atuar a fim de parar a proliferação celular em qualquer dessas fases do ciclo celular. A proteína actina presente em todas as amostras está incluída como “controle quantitativo” para assegurar que quantidades iguais de proteína foram adicionadas às três canaletas do gel antes da eletroforese. (Cortesia de K. H. Vousden.)

Figura 9.10 Genótipo de p53 e respostas celulares à irradiação Timócitos (leucócitos derivados do timo) de camundongos tipo selvagem demonstraram uma perda de 80% da viabilidade durante as 25 horas que se seguiram à irradiação X (*verde*), enquanto timócitos provenientes de camundongos heterozigotos p53^{+/-} (com um alelo tipo selvagem e outro nulo) demonstraram similar perda de viabilidade (*vermelho*). Em contraste, timócitos preparados a partir de camundongos homozigotos p53^{-/-} mutantes exibiram menos que 5% de perda da viabilidade durante esse período de tempo (*azul*). Em todos os casos, a perda de viabilidade foi atribuída a apoptose. (De S. W. Lowe *et al.*, *Nature* 362: 847-849, 1993.)



Essa via não é dependente de cinases intermediárias para induzir o aumento dos níveis de p53 e sinalização. Os mecanismos pelos quais outras situações de estresse fisiológico e desequilíbrios, tais como hipóxia, desencadeiam o aumento nos níveis de p53 ainda permanecem pouco entendidos.

Essas vias convergentes de sinalização revelam uma profunda vulnerabilidade da célula mamífera. Esta tem confiado a uma única proteína – p53 – a tarefa de receber sinais de observatórios que estão encarregados de monitorar uma ampla variedade de importantes sistemas fisiológicos e bioquímicos intracelulares (Figura 9.8). O afunilamento desses diversos sinais a uma única proteína parece representar um elegante e econômico desenho do circuito de sinalização celular. Porém, isso coloca as células em uma desvantagem maior, desde que a perda de sua única proteína do circuito regulador da célula resulta na perda catastrófica da capacidade desta em monitorar o seu próprio bem-estar e responder com contramedidas apropriadas quando alguns sistemas operacionais não funcionam bem.

Em um determinado curso (na verdade, os dois eventos que causam a inativação sucessiva das duas cópias do gene *p53*), a célula torna-se cega a muitos de seus próprios defeitos. Entretanto, ela ganha a habilidade de continuar a proliferação ativa sob circunstâncias que normalmente causariam a parada desta ou o desencadeamento da morte apoptótica. Em adição, como aprenderemos brevemente, a perda do reparo do DNA e das funções que estabilizam o genoma, promovidos pela proteína p53, deixará descendentes de uma célula *p53*^{-/-}, mais provavelmente para adquirir mutações adicionais e avançar mais rapidamente à malignidade (p. ex., veja a Barra lateral 9.2).

9.7 A batalha de Mdm2 e ARF sobre o destino de p53

Os diversos sinais de alarme que implicam sobre p53 possuem um efeito comum – causam um rápido aumento nos níveis dessa proteína. Pesquisadores têm começado a entender como essa dramática mudança é alcançada. Assim como um amplo arranjo de outras proteínas celulares, as moléculas da proteína p53 são degradadas pela ubiquitina – sistema proteassomo. Como descrito na Barra lateral 7.8, proteínas que são destinadas a serem degradadas por esse sistema são inicialmente marcadas pelo acoplamento covalente de cadeias laterais de poliubiquitinas, as quais transportam as proteínas aos proteassomos, onde estas são digeridas em oligopeptídeos. O ponto de controle crítico, nesse processo, é a marcação inicial.

A degradação de p53 em células normais, não-perturbadas, é regulada por uma proteína chamada Mdm2 (em células de camundongo) e Hdm2 (em células humanas). Essa proteína reconhece p53 como um alvo que deveria ser ubiquitinilado logo após sua síntese e, assim, ser marcada para destruição (Figura 9.11). Mdm2 foi inicialmente identificada como uma proteína codificada por cromossomos de duplo minuto presentes em células de sarcoma murino (*mouse double minutes*). Subseqüentemente, descobriu-se que o homólogo humano do gene *mdm2* é freqüentemente amplificado em sarcomas. Em muitos tumores humanos de pulmão, Mdm2 (como a chamaremos) é superexpressa por meio de mecanismos que permanecem desconhecidos.

Como é o caso com outros oncogenes, pareceu, primeiro, que a amplificação do gene *mdm2* (indicado pela presença de muitas partículas cromossômicas de duplo minuto em células tumorais; veja a Figura 1.12) forneceu alguma vantagem proliferativa imediata, direta, às células tumorais. Somente muito tempo depois da proteína Mdm2 ter sido identificada é que seu papel como agente de destruição de p53 se tornou aparente. De fato, os efeitos detalhados exercidos por Mdm2 em p53 são sutilmente mais complexos do que como indicado anteriormente.

Como aprenderemos a seguir, p53 atua como um fator transcricional; a ligação de Mdm2 a p53 bloqueia imediatamente a capacidade de p53 de realizar sua função. Depois disso, Mdm2 direciona a ligação de uma molécula de ubiquitina a p53 e a exportação desta do núcleo (onde p53 realiza a maior parte de seu trabalho) para o citoplasma; a subseqüente poliubiqui-

Barra lateral 9.2 Luz solar, p53 e câncer de pele A proteína p53 permanece como um importante guardião contra o câncer de pele provocado pela luz solar. Na ocasião em que o genoma de um queratinócito na pele sofre extensos danos por meio da radiação ultravioleta B (UV-B), a proteína p53 rapidamente desencadeará sua morte celular por apoptose. Uma manifestação disso é a descamação extensiva da pele vários dias após a exposição ao sol. Ao mesmo tempo, a exposição ao UV-B pode causar a mutação e inativação funcional de um gene *p53* dentro de um queratinócito. Isso é indicado pelo fato de que alelos *p53* mutantes encontrados em carcinomas celulares humanos escamosos de pele várias vezes ocorrem em sítios de dipirimidina – precisamente os sítios nos quais os raios UV-B induzem a formação de ligações cruzadas pirimidina-pirimidina (veja a Seção 12.6). Tais alelos *p53* mutantes também podem ser encontrados externamente na pele normal que tem sofrido danos solares crônicos. Uma vez que a função de p53 é comprometida por essas mutações, os queratinócitos podem ser capazes de sobreviver a subseqüentes exposições à irradiação UV-B, pois a apoptose não tardará muito a ser desencadeada por sua proteína p53. Tais células *p53* mutantes podem, dessa forma, adquirir alelos mutantes adicionais, que juntos possibilitam a formação de um carcinoma celular escamoso. Interessantemente, camundongos que não possuem cópias funcionais do gene *p53* em todas as células também respondem à exposição ao UV-B por meio do desenvolvimento de melanomas oculares – tumores de células pigmentadas do olho –; tumores similares são suspeitos de serem causados em humanos pela exposição ao UV.

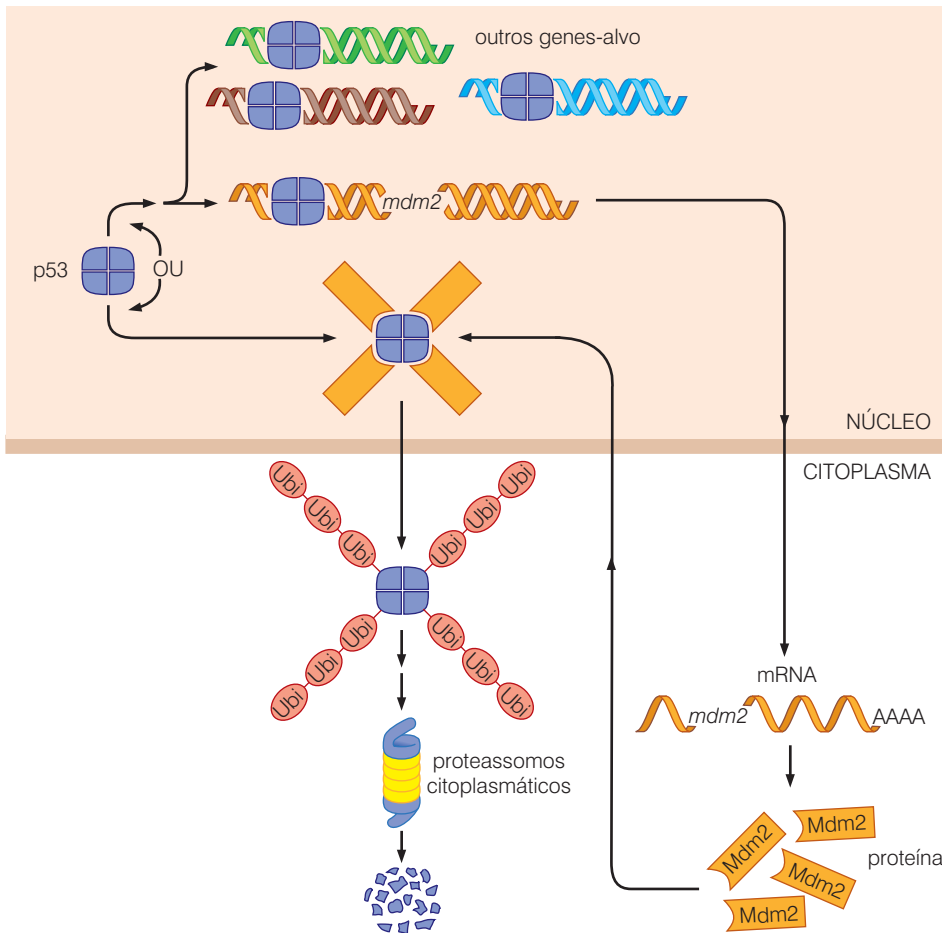
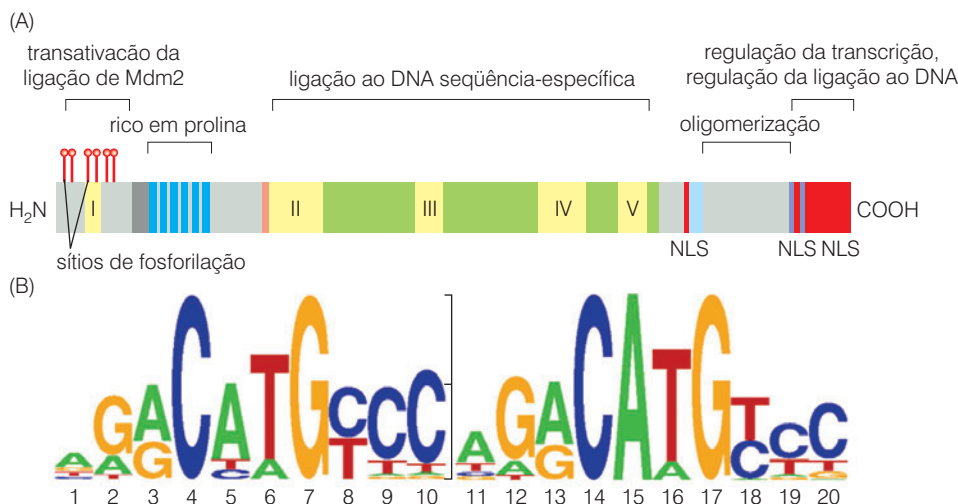


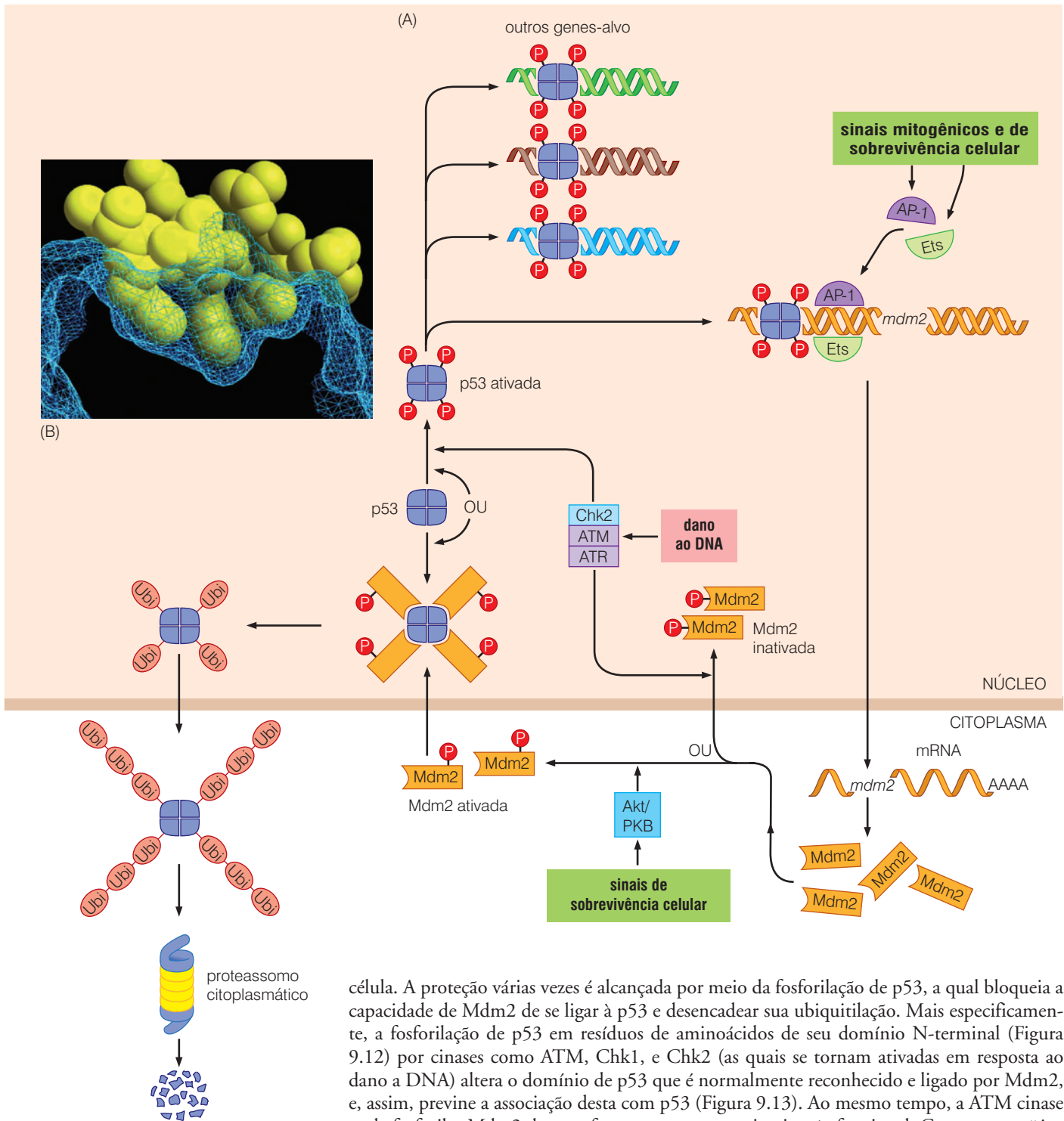
Figura 9.11 Controle dos níveis de p53 por Mdm2. Após o aumento das concentrações de p53 em resposta a determinados sinais fisiológicos (*não-mostrado*), os tetrâmeros de p53 ligam-se aos promotores de um grande grupo de genes-alvo, os quais têm sua transcrição induzida (*acima*). Dentre os genes induzidos está *mdm2*; isso resulta em um grande aumento de seu mRNA e de proteína Mdm2 (*direita*). Uma vez sintetizadas, moléculas de Mdm2 ligam-se a subunidades de proteínas p53 e desencadeiam a ubiquitilação destas e sua exportação ao citoplasma, onde serão degradadas nos proteassomos. Essa retroalimentação negativa assegura que os níveis de p53 finalmente retornem a um baixo nível e, em células não-perturbadas, ajuda a manter os níveis de p53 bastante baixos.

tilação de p53 assegura sua rápida degradação em proteassomos citoplasmáticos (veja a Figura 9.11). As contínuas e altamente eficientes ações de Mdm2 asseguram a curta meia-vida de 20 minutos de p53 em células normais, não-perturbadas.

Em algumas circunstâncias – especificamente, quando células estão sofrendo determinados tipos de estresse ou dano –, moléculas de proteína p53 devem ser protegidas de seu executor Mdm2, de maneira que possam ser acumuladas em níveis funcionalmente significativos na

Figura 9.12 Domínios especializados de p53. (A) A proteína p53 liga-se ao DNA por meio de seu domínio central de ligação a DNA (*amarelo, verde*). Este é ligado por Mdm2 (veja a Figura 9.11) em um pequeno domínio próximo à sua extremidade N-terminal, onde seu domínio de transativação (envolvido na ativação da transcrição) também está localizado. A fosforilação de resíduos de aminoácidos de p53 nesta região (*pirulitos vermelhos; nem todos estão indicados*) bloqueia a ligação de Mdm2 e salva p53 da ubiquitilação e degradação. Em sua extremidade C-terminal, um domínio de oligomerização (*cinza; veja a Figura 9.7A*) permite a formação dos tetrâmeros. Próximo à extremidade C-terminal também se encontram sinais de localização nuclear (NLS, *vermelho*), que permitem sua importação para o núcleo, assim como seqüências de aminoácidos que regulam sua ligação ao DNA. O domínio rico em prolina (*azul*) próximo da extremidade N-terminal contribui para as funções pró-apoptóticas de p53. (B) O uso de anticorpos anti-p53 permite a imunoprecipitação de complexos p53-DNA presentes na cromatina de células humanas (procedimento ChIP). Análises sofisticadas de seqüência de fragmentos de DNA nos precipitados levaram à identificação de 452 sítios aos quais p53 se liga no genoma humano. A seqüência consenso de DNA à qual p53 se liga é mostrada nesta figura, em que o tamanho relativo de cada letra indica o quão freqüente uma base de DNA foi encontrada na posição indicada no sítio de ligação. (A, de D. E. Fisher, ed. *Tumor Suppressor Genes in Human Cancer*. Totowa, NJ: Humana Press, 2000; B, a partir de C. L. Wei, *Cell* 124: 207-219, 2006.)





célula. A proteção várias vezes é alcançada por meio da fosforilação de p53, a qual bloqueia a capacidade de Mdm2 de se ligar à p53 e desencadear sua ubiquitilação. Mais especificamente, a fosforilação de p53 em resíduos de aminoácidos de seu domínio N-terminal (Figura 9.12) por cinases como ATM, Chk1, e Chk2 (as quais se tornam ativadas em resposta ao dano a DNA) altera o domínio de p53 que é normalmente reconhecido e ligado por Mdm2, e, assim, previne a associação desta com p53 (Figura 9.13). Ao mesmo tempo, a ATM cinase pode fosforilar Mdm2 de uma forma que cause sua inativação funcional. Como consequência dessa fosforilação de ambas, p53 e Mdm2, esta última falha em iniciar a ubiquitilação de p53, e, então, p53 escapa da destruição e tem sua concentração rapidamente aumentada na célula. Uma vez presente em quantidades substanciais, p53 é postada a recrutar uma série de respostas *downstream*, a serem discutidas a seguir.

Note que Mdm2 atua aqui como uma oncoproteína, porém uma cujo mecanismo de ação é muito diferente daqueles das várias oncoproteínas que encontramos nos Capítulos 4, 5 e 6. Estas funcionam como componentes de cascatas de sinais mitogênicos e, assim, induzem a proliferação celular mimetizando os sinais normalmente desencadeados pela ligação de fato-

Figura 9.13 Controle dos níveis de p53 por diversas cinases (A) O ciclo de síntese e destruição de p53 indicado na Figura 9.11 pode ser modulado por uma série de reguladores. Cinases sensíveis a dano ao DNA, tais como ATM e ATR, atuando direta ou indiretamente por meio de Chk2, podem fosforilar p53 (*centro*) no seu domínio N-terminal (veja a Figura 9.12), que previne a ligação de Mdm2 (*dourado, no centro à esquerda*). Ao mesmo tempo, a fosforilação de moléculas de Mdm2, realizada por essas cinases, bloqueia a sua habilidade de se associar à p53 (*centro*). Essas alterações salvam p53 da ligação mediada por Mdm2, da ubiquitilação e da destruição em proteassomos (*abaixo à esquerda*) que poderiam ocorrer. Atuando de maneira oposta, determinados sinais de sobrevivência (como aqueles transportados por fatores de crescimento mitogênicos), agindo por meio dos fatores de transcrição AP-1 e Ets, colaboram com p53 para promover a expressão do gene *Mdm2* (*centro à direita*), resultando no aumento do mRNA e na síntese proteica de Mdm2 (*abaixo à direita*). Esses sinais de sobrevivência também ativam a Akt/PKB cinase, a qual fosforila e ativa as moléculas Mdm2 já sintetizadas em outro sítio (*abaixo*). A proteína resultante Mdm2 ativada então realiza sua ligação à p53 e desencadeia a ubiquitilação desta e sua posterior destruição mediada por proteassomos (*abaixo, à esquerda*). (Recentes evidências sugerem que p53 se torna monoubiquitilada no núcleo e poliubiquitilada no citoplasma.) (B) A estrutura da interface em que p53 e Mdm2 interagem tem sido revelada por cristalografia de raios X. O domínio interativo de p53 é mostrado como um modelo amarelo de espaço preenchido que inclui os resíduos 18 a 27 de p53, enquanto a superfície do bolsão complementar de Mdm2 é mostrada como um emaranhado de fio azul. A fosforilação de p53 por cinases como Chk2, ATM e ATR previne essa interação, poupando p53 da ubiquitilação mediada por Mdm2 e subsequente degradação. (B, de P. H. Kussie *et al.*, *Science* 274: 948-953, 1996.)

res de crescimento a seus receptores. Em contraste, Mdm2 atua antagonizando p53 e, dessa forma, previne a entrada de uma célula na apreensão do ciclo celular, entrando em um estado estacionário de crescimento conhecido como **senescência**, ou no programa suicida apoptótico. Entretanto, o resultado final é o mesmo: as ações de ambas, oncoproteínas e Mdm2, favorecem o aumento no número celular.

A atividade e os níveis da proteína Mdm2 são afetados, ainda, por outros sinais positivos e negativos. A via de sinalização que favorece a sobrevivência celular por meio da ativação da via da PI3 cinase (PI3K) leva, por meio da Akt/PKB cinase, à fosforilação de Mdm2 (em um sítio diferente daquele alterado pela ATM cinase descrito anteriormente) e à translocação resultante de Mdm2 do citoplasma ao núcleo, onde esta é postada a atacar p53 (veja a Figura 9.13). Em virtude de PI3K, sozinha, ser ativada por Ras e por receptores de fatores de crescimento, viemos a pensar que a via de sinalização mitogênica influencia, de fato, Mdm2 e, assim, p53, embora indiretamente. Ao mesmo tempo, a ativação da via de sinalização mitogênica Ras→Raf→MAPK leva, por meio dos fatores de transcrição Ets e AP-1 (Fos + Jun), à transcrição bastante elevada do gene *mdm2*, resultando em altos níveis de mRNA e proteína Mdm2 (veja a Figura 9.13). Esses níveis elevados de proteína Mdm2 amplificam a ativação induzida por fosforilação de Mdm2 alcançada pela via de sinalização PI3K→Akt/PKB. Finalmente, todos esses efeitos convergem na supressão dos níveis da proteína p53.

Ainda um outro mecanismo que afeta Mdm2 tem sido revelado por meio da descoberta de um antagonista de Mdm2, que é chamado p19^{ARF} em células de camundongo e p14^{ARF} em células humanas. Uma análise eficiente de seqüência levou à descoberta de ARF, como a chamaremos daqui por diante. Seu gene codificante foi originalmente descoberto em células de camundongo como um gene do qual as seqüências estão intercaladas com aquelas que especificam p16^{INK4A}, o importante inibidor das cinases CDK4 e CDK6 que iniciam a fosforilação de pRb (Seção 8.4).

Por meio do uso de um promotor transcricional localizado 13 quilobases *upstream* do promotor de p16^{INK4A} e de um programa de *splicing* alternativo, um mRNA é produzido e codifica uma fase de leitura alternativa (ARF, do inglês *alternative reading frame*), a estrutura

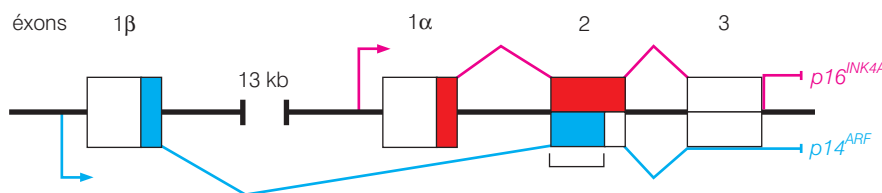


Figura 9.14 O gene codificante de p16^{INK4A} e p14^{ARF} A análise do gene p16^{INK4A} (vermelho) tem revelado que este compartilha seu segundo éxon com um segundo gene codificando uma proteína de 19 kDa em camundongos e 14 kDa em humanos. O gene codificante desta proteína p14/19 utiliza um promotor transcricional alternativo (*seta azul, à esquerda*) localizado a mais de 13 kb *upstream* daquele utilizado por p16^{INK4A} (*seta vermelha, centro*); pela razão de que a tradução de seu mRNA utiliza uma fase de leitura alternativa (*forquilha*) presente nesse éxon 2 (*vermelho, azul*), a proteína resultante e, então, o gene, vêm a se chamar p19^{ARF} (ou em humanos p14^{ARF}). Os padrões de *splicing* de RNA são indicados pelos sinais de intercalação que conectam os diversos éxons de dois genes intercalados. As caixas indicam éxons, enquanto as áreas preenchidas dentro de cada éxon indicam fases de leitura. (De C. Sherr, *Genes Dev.* 12: 2984-2991, 1998.)

da proteína ARF (Figura 9.14). A expressão forçada de um cDNA codificante para ARF em células de roedores tipo selvagem causou uma forte inibição da proliferação celular. Entretanto, essa inibição não foi observada quando o cDNA de ARF foi expresso em células que não apresentavam a função tipo selvagem de p53. Isso indicou que os poderes inibidores de crescimento de ARF dependem absolutamente da presença de p53 funcional nessas células.

Investigações adicionais revelaram que, em células tipo selvagem, a expressão de ARF causa um rápido aumento dos níveis de p53. Agora entendemos os mecanismos moleculares que

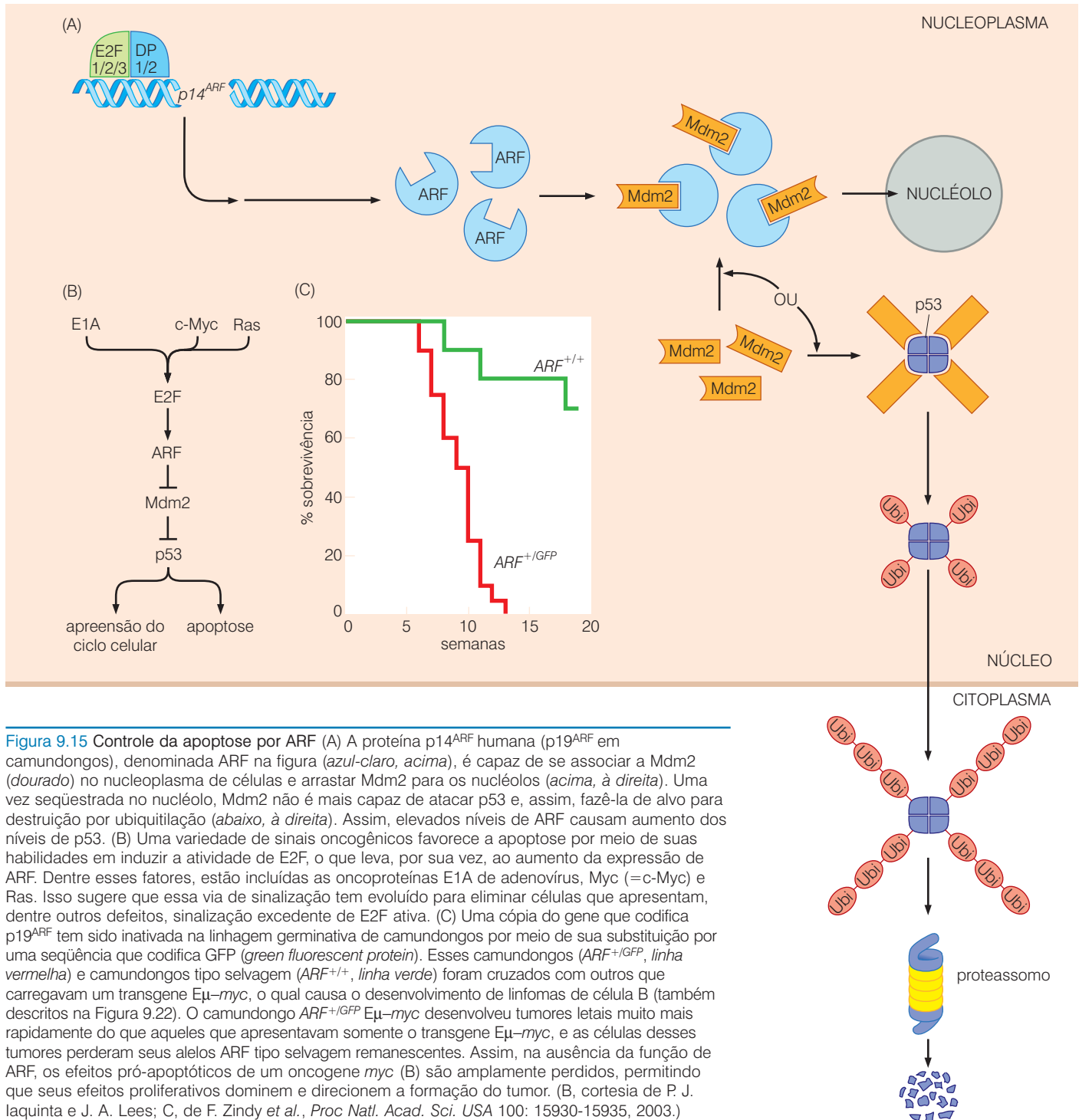


Figura 9.15 Controle da apoptose por ARF (A) A proteína p14^{ARF} humana (p19^{ARF} em camundongos), denominada ARF na figura (azul-claro, acima), é capaz de se associar a Mdm2 (dourado) no nucleoplasma de células e arrastar Mdm2 para os nucléolos (acima, à direita). Uma vez sequestrada no nucléolo, Mdm2 não é mais capaz de atacar p53 e, assim, fazê-la de alvo para destruição por ubiquitinação (abaixo, à direita). Assim, elevados níveis de ARF causam aumento dos níveis de p53. (B) Uma variedade de sinais oncogênicos favorece a apoptose por meio de suas habilidades em induzir a atividade de E2F, o que leva, por sua vez, ao aumento da expressão de ARF. Dentre esses fatores, estão incluídas as oncoproteínas E1A de adenovírus, Myc (=c-Myc) e Ras. Isso sugere que essa via de sinalização tem evoluído para eliminar células que apresentam, dentre outros defeitos, sinalização excedente de E2F ativa. (C) Uma cópia do gene que codifica p19^{ARF} tem sido inativada na linhagem germinativa de camundongos por meio de sua substituição por uma sequência que codifica GFP (green fluorescent protein). Esses camundongos (*ARF^{+/-GFP}*, linha vermelha) e camundongos tipo selvagem (*ARF^{+/+}*, linha verde) foram cruzados com outros que carregavam um transgene Eμ-myc, o qual causa o desenvolvimento de linfomas de célula B (também descritos na Figura 9.22). O camundongo *ARF^{+/-GFP}* Eμ-myc desenvolveu tumores letais muito mais rapidamente do que aqueles que apresentavam somente o transgene Eμ-myc, e as células desses tumores perderam seus alelos ARF tipo selvagem remanescentes. Assim, na ausência da função de ARF, os efeitos pró-apoptóticos de um oncogene myc (B) são amplamente perdidos, permitindo que seus efeitos proliferativos dominem e direcionem a formação do tumor. (B, cortesia de P. J. laquinta e J. A. Lees; C, de F. Zindy *et al.*, *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 100: 15930-15935, 2003.)

explicam como essa resposta acontece. A proteína ARF liga-se à Mdm2 e inibe a ação desta, aparentemente por meio do sequestro de Mdm2 no nucléolo – estrutura nuclear que é grandemente devotada a produzir subunidades ribossômicas (Figura 9.15A).

Uma vez Mdm2 sendo desviada para longe de suas interações com p53, esta escapa da ubiquitilação mediada por Mdm2 e subsequente destruição e, além disso, acumula-se rapidamente em altos níveis na célula. O inimigo de um inimigo é um amigo: ARF pode induzir rápidos aumentos dos níveis de p53, porque sequestra e inibe o destruidor de p53, Mdm2.

De forma importante, em células normais, não-estressadas, Mdm2 deve poder exercer seu papel na manutenção dos baixos níveis de p53. Por outro lado, p53 poderá alcançar níveis intolerantemente altos e inapropriadamente cessar a proliferação celular ou induzir a apoptose (Barra lateral 9.3).

A série de antagonistas indicados na Figura 9.15 faz de ARF uma aliada de p53 e, como esta, uma proteína supressora de tumor. Em muitos tumores humanos, a inativação do loco *p16^{INK4A}/p14^{ARF}* por mutação genética ou metilação hipergenética do promotor pode ser verificada. Uma vez que uma célula tenha perdido a atividade de ARF, ela perde a capacidade de bloquear a função de Mdm2. Como consequência, Mdm2 fica livre para direcionar a degradação de p53, e a célula é privada das atividades de p53 por esta não poder ser acumulada em níveis funcionalmente significativos. Como ARF exerce um papel fundamental no aumento dos níveis de p53 em muitos contextos celulares, isso significa que o gene *p14^{ARF}*, assim como o gene que codifica o seu alvo, p53, é um gene supressor de tumor extremamente importante. Além disso, parece provável que muitas das células cancerosas humanas que retêm cópias do gene *p53* tipo selvagem tenham eliminado a função de p53 por meio da inativação de suas duas cópias do gene que codifica ARF. Finalmente, deveríamos notar que a co-localização dos genes *p16^{INK4A}* e *p14^{ARF}* (veja a Figura 9.14) representa, ainda, uma outra concentração de poder que cria uma vulnerabilidade adicional para células normais (Barra lateral 9.4).

9.8 ARF e a apoptose mediada por p53 protegem contra o câncer por meio do monitoramento da sinalização intracelular

O papel influenciador de ARF em aumentar os níveis de p53 levanta a questão de como a própria ARF é regulada. Nessa etapa, aprendemos algo altamente relevante a partir de nossa discussão sobre a via de pRb no Capítulo 8, e a partir do fato de que as células mamíferas são bastante sensíveis aos níveis de atividade de E2F1 maiores do que o normal. Na verdade, uma

Barra lateral 9.3 Mdm2 e p53 estão presas em um agarramento mortal As ações antagonistas de Mdm2 e p53 são destacadas por meio dos resultados de inativação de ambas as cópias do gene *mdm2* nos genomas de embriões de camundongos. Estes morreram muito cedo na embriogênese, ostensivamente por causa dos níveis aumentados de p53 nas células embrionárias até níveis fisiologicamente intoleráveis, prevenindo a proliferação normal das células embrionárias ou causando sua morte. Como discutido anteriormente (Seção 9.2), a inativação de ambas as cópias do gene *p53* não provoca efeitos no desenvolvimento embrionário. Entretanto, quando ambas as cópias dos genes são inativadas em um embrião de camundongo (resultando no genótipo *Mdm2^{-/-} p53^{-/-}*), o desenvolvimento ocorre de forma perfeitamente normal. Em conjunto, esses resultados indicam que os efeitos profundamente destrutivos da inativação do gene *Mdm2* podem ser totalmente atribuídos à atividade de p53 e que podem ser completamente revertidos pela remoção desta proteína. Tal resultado claro e não-ambíguo é raramente observado em experimentos desse tipo, já que a maioria dos genes e proteínas exerce múltiplos efeitos que fazem com que os resultados de experimentos dramaticamente simples como este sejam bastante incomuns.

Barra lateral 9.4 As células de mamíferos têm colocado muitos ovos em uma cesta? A descoberta do loco genético *p16^{INK4A}/p14^{ARF}*, o qual é inativado por meio de um mecanismo em cerca da metade de todos os tumores humanos, levanta uma instigante questão: por que as células mamíferas investiram em um único loco cromossomal com o poder de codificar duas proteínas que regulam as duas vias supressoras de tumor mais importantes, aquelas de pRb e p53? A deleção desse único loco resulta na perda simultânea da regulação normal de ambas as vias. Como foi o caso com a própria p53, um enorme poder tem se concentrado nas mãos de um único loco genético.

Colocar dois ovos vitais em uma única cesta genética parece muito atrevimento da célula mamífera, já que isso causa sua vulnerabilidade a dois tipos de desregulação por meio da perda de um único gene. Para piorar a situação, o gene que codifica *p15^{INK4B}*, outro importante regulador da fosforilação de pRb (Seção 8.4), está intimamente ligado ao loco *p16^{INK4A}/p14^{ARF}*, na verdade tão próximo que todos esses elementos genéticos são várias vezes perdidos por meio da deleção de somente cerca de 40 kb de DNA cromossomal. Ainda temos que discernir o entendimento racional desse arranjo genético. Talvez não exista nada, e, talvez, a evolução dos mamíferos tenha produzido um projeto não tão bom de uma parte da maquinaria regulatória celular.

célula parece monitorar o nível da atividade desse fator de transcrição em particular (talvez junto com aqueles de E2F2 e E2F3) como uma indicação de se o seu circuito pRb está funcionando apropriadamente; níveis excessivamente altos dos fatores de transcrição E2F ativos fornecem um sinal intrigante de que a função de pRb falhou.

A evolução tem criado diversas formas para eliminar células que apresentam muita atividade de E2F e, por implicação, têm perdido o controle próprio de pRb (Figura 9.16). A atividade de E2F1 coordena a expressão de um número de genes que codificam proteínas que participam diretamente do programa apoptótico. Dentre esses, estão incluídos genes que codificam **caspases** (tipos 3, 7, 8 e 9), proteínas relacionadas a Bcl-2 pró-apoptótica (Bim, Noxa, PUMA), Apaf-1, e a 'prima' de p53, p73; essas proteínas colaboram para direcionar as células à apoptose. Aprenderemos sobre elas mais tarde.

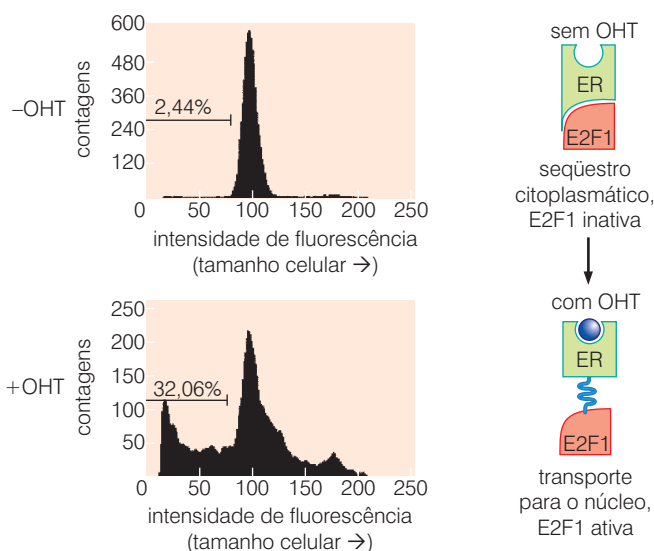
Em adição, o programa apoptótico dependente de p53 é frequentemente desencadeado pela alta atividade de E2F. Ele revela que o gene *p14^{ARF}* carrega uma sequência de reconhecimento à E2F em seu promotor. De uma maneira que ainda permanece sem entendimento, altos níveis não-comuns de atividade de E2F1 ou E2F2 induzem a transcrição do mRNA de *p14^{ARF}*. A proteína ARF logo entra em cena e bloqueia a ação de Mdm2. A proteína p53, então, é acumulada e desencadeia, por sua vez, a apoptose (veja a Figura 9.15A, B), levando à cascata de sinalização configurada abaixo:



Essa via, operando junto com os diversos sinais pró-apoptóticos independentes de p53 citados anteriormente, acompanha o objetivo de eliminar células que não apresentam a função correta de pRb. Tal apoptose iniciada por E2F parece explicar por que embriões de camundongos que têm sido privados de ambas as cópias de seu gene *Rb* morrem no meio da gestação devido à excessiva proliferação e concomitante apoptose de alguns tipos celulares críticos, incluindo aqueles envolvidos na eritropoiese (formação de células sanguíneas vermelhas) e na função placentária.

Figura 9.16 Indução de apoptose mediada por E2F1 O estado apoptótico das células pode ser monitorado por um separador celular ativado por fluorescência (FACS), o qual, neste caso, é utilizado para medir o tamanho individual das células ou fragmentos subcelulares (*abscissa*) e o número de células de um dado tamanho (*ordenada*). Nesse experimento, o fator de transcrição E2F1 (E2F, *verde*) foi fusionado à proteína receptora de estrogênio (ER) (*vermelho*), fazendo com que a atividade de E2F1 dependesse da presença de tamoxifen (OHT), um ligante de ER. Na ausência deste ligante (*painel superior*), o fator E2F1 é sequestrado no citoplasma; sob essa condição, quase todas as células em tal população apresentam um tamanho de aproximadamente 100 (arbitrário) unidades (com 2,44% possuindo um tamanho menor). Entretanto, quando o tamoxifen é adicionado nessas células (*painel inferior, círculo roxo*), NLS é exposta, e a proteína de fusão contendo E2F1 é importada para o núcleo e se torna ativada, resultando na expressão de um conjunto de genes, dentre eles os que possuem efeitos pró-apoptóticos. Como resultado, uma proporção significativa de células (32,06%) agora apresenta um tamanho menor do que as células normais saudáveis, indicativo de sua fragmentação durante o processo de apoptose. (De T. Hershko e D. Ginsberg, *J. Biol. Chem.* 279: 8627-8634, 2004.)

A descoberta do papel crítico de ARF no controle da função de p53 sugeriu a possibilidade de que a função de ARF é eliminada por uma variedade de estratégias moleculares durante a formação do tumor. Tal eliminação pode conferir a células cancerosas os mesmos benefícios daqueles resultantes da mutação do gene *p53*. De fato, a regulação da transcrição do gene *p14^{ARF}* é igualmente complexa e, por isso, suscetível a erros por meio de uma variedade de alterações.



Em resumo, já que a perda do controle de pRb dentro da célula representa um grave perigo ao tecido circundante, as células são postadas a desencadear a apoptose sempre que a desregulação de E2F1 ocorra. Essas conexões entre a atividade de E2F1 e a apoptose sugerem outra idéia ainda especulativa: a grande maioria das células que sofre perda do controle de pRb nunca continua a geração de clones de descendentes pré-neoplásicos ou neoplásicos, pois essas células sofrem apoptose tão logo elas perdem esse importante mecanismo de controle.

Consistente com essa lógica, estão algumas das propriedades conhecidas dos oncogenes *E1A* e *myc*. Ambos desregulam o controle de pRb e são altamente eficientes na indução da apoptose. Lembre que a oncoproteína E1A de adenovírus liga-se e efetivamente seqüestra pRb e suas “primas”. Myc, por sua vez, puxa alavancas regulatórias do relógio do ciclo celular que asseguram que pRb seja inativada por meio de fosforilação (Seções 8.5 e 8.9).

Muitos estudos da função do oncogene *myc* indicam que este exerce ambas as funções, mitogênica e pró-apoptótica. Certamente, os efeitos pró-apoptóticos do oncogene *myc* são tão fortes que é altamente provável que a maioria das células que o adquirem são rapidamente eliminadas por meio de apoptose. Na ocasião, o programa apoptótico pode ser enganado ou inativado, e somente assim as ações mitogênicas de *myc* se tornariam aparentes.

Como exemplo, quando um oncogene *myc* torna-se ativado no tecido linfóide de um camundongo, ele provoca um aumento substancial na proliferação celular. Entretanto, não existe nenhum aumento no número celular, uma vez que as novas células formadas são rapidamente perdidas por apoptose. Caso uma das células que apresentam o oncogene *myc* inative subsequentemente suas cópias do gene *p53*, então a apoptose induzida por *myc* é diminuída, e a proliferação celular coordenada por esse gene leva a um aumento no *pool* de células linfóides mutantes. Como pode se esperar a partir da organização da via descrita anteriormente, um efeito similar atua no camundongo que apresenta somente um único gene *p19^{ARF}* funcional (veja a Figura 9.15C).

Essas discussões sugerem que a apoptose induzida por E2F funciona unicamente como um mecanismo anti-câncer designado a eliminar células pré-neoplásicas não desejadas. Entretanto, uma pesquisa com camundongos geneticamente modificados comprovou que os mecanismos fisiológicos normais também dependem da apoptose induzida por E2F para remover células extras que não são necessárias para o desenvolvimento do sistema imune normal.

9.9 p53 atua como um fator de transcrição que pára o avanço do ciclo celular em resposta ao dano no DNA e que tenta auxiliar no processo de reparo

A proteína p53 possui um domínio de ligação ao DNA (veja a Figura 9.12A) com uma afinidade para ligar um motivo de seqüência composto de Pu-Pu-Pu-C-A/t-T/a-G-Py-Py-Py repetido duas vezes em *tandem* (em que Pu representa os nucleotídeos purínicos A ou G, enquanto Py representa os nucleotídeos pirimidínicos C ou T; A/t representa um sítio no qual A ocorre mais freqüentemente que T; e T/a denota um sítio em que T ocorre mais freqüentemente que A). Foi observado que entre 0 a 13 nucleotídeos com uma seqüência aleatória separam essas duas seqüências de reconhecimento arranjadas em *tandem* (veja a Figura 9.12B). Esse motivo de seqüência está presente nos promotores ou íntrons iniciais de vários genes-alvo *downstream*, cuja expressão é induzida (ou reprimida) por p53.

Na verdade, os poderes ativadores de transcrição do tetrâmero p53 dependem de, mais do que simplesmente, do reconhecimento e ligação dessa seqüência dentro de um promotor. Além disso, um complexo arranjo de modificações covalentes de p53 deve ocorrer, várias afetando o domínio C-terminal dessa proteína. Estas incluem acetilação, glicosilação, fosforilação, ribosilação e sumoilação (envolvendo o acoplamento de grupos acetil, açúcares, fos-

fato, ribose e sumo, respectivamente, este último sendo um peptídeo como a ubiquitina, que aparece para encaminhar proteínas para localização a sítios intracelulares específicos, várias vezes no núcleo; veja a Figura 9.35). Essas modificações provavelmente afetam a capacidade de p53 em interagir fisicamente com outros fatores de transcrição que modulam seus poderes transcricionais. Na verdade, parece que interações combinatoriais de p53 com esses outros fatores determinam as identidades dos genes-alvo específicos que são ativados em várias circunstâncias por p53.

Significativamente, como descrito na Figura 9.6B, a grande maioria (> 90%) dos alelos *p53* mutantes encontrados nos genomas de células tumorais humanas codifica substituições de aminoácidos no domínio de ligação ao DNA de p53. As proteínas p53 defectivas resultantes, sendo incapazes de se ligarem aos promotores dos genes-alvo *downstream*, têm, conseqüentemente, perdido a habilidade de mediar a maioria, senão todas, das múltiplas funções de p53.

Como sugerido anteriormente, um alvo extremamente importante do fator de transcrição p53 é o gene *Mdm2*. Como conseqüência, quando ativa como um fator de transcrição, p53 incentiva a síntese de Mdm2 – o agente de sua própria destruição (veja a Figura 9.11). Isso cria um mecanismo de retroalimentação negativa que geralmente funciona para assegurar que moléculas de p53 serão degradadas tão logo tenham sido sintetizadas, resultando em níveis muito baixos de estado estacionário de proteína p53, observados em células normais.

As operações dessa retroalimentação p53-Mdm2 explicam um aspecto estranho do comportamento de p53. Em células cancerosas humanas que possuem alelos *p53* mutantes, defectivos, a proteína p53 está quase invariavelmente presente em altas concentrações (p. ex., veja a Figura 9.17), em contraste à sua ausência virtual em células normais. À primeira vista, isso pode parecer paradoxal, uma vez que os níveis de uma proteína supressora de crescimento como p53 pareceriam ser incompatíveis com proliferação celular maligna.

O paradoxo é resolvido pelo fato de que, como mencionado anteriormente, a grande maioria das mutações que afetam o gene *p53* causa a perda dos poderes ativadores transcricionais da proteína. Como conseqüência direta, p53 torna-se incapaz de induzir a transcrição de *Mdm2* e, então, a síntese desta proteína. Na ausência de Mdm2, p53 escapa da degradação e acumula-se em níveis bastante altos. Isso significa que muitos tipos de células cancerosas humanas acumulam altas concentrações de moléculas p53 essencialmente inertes.

Essa lógica explica por que a presença de p53 prontamente detectável em uma população de células tumorais, geralmente revelada por meio de **imunocoloração** (veja a Figura 9.17), é um sinal indicador da presença de um alelo *p53* mutante no genoma dessas

Figura 9.17 Acúmulo de p53 em células *p53* mutantes Esta secção microscópica de tecido ovariano foi marcada com um anticorpo anti-p53, o qual está acoplado à enzima peroxidase, resultando no núcleo escurecido visto aqui. Grandes manchas de células epiteliais no carcinoma ovariano (acima) são compostas de células que apresentam altos níveis de p53; uma mancha de displasia também é positiva para p53 (centro, à esquerda). Células do estroma (pequenos núcleos pretos, matriz rosa, abaixo) não se encontram marcadas, como é a mancha da superfície epitelial ovariana normal (OSE, abaixo, à direita). (Cortesia de R. Drapkin e D. M. Livingston.)

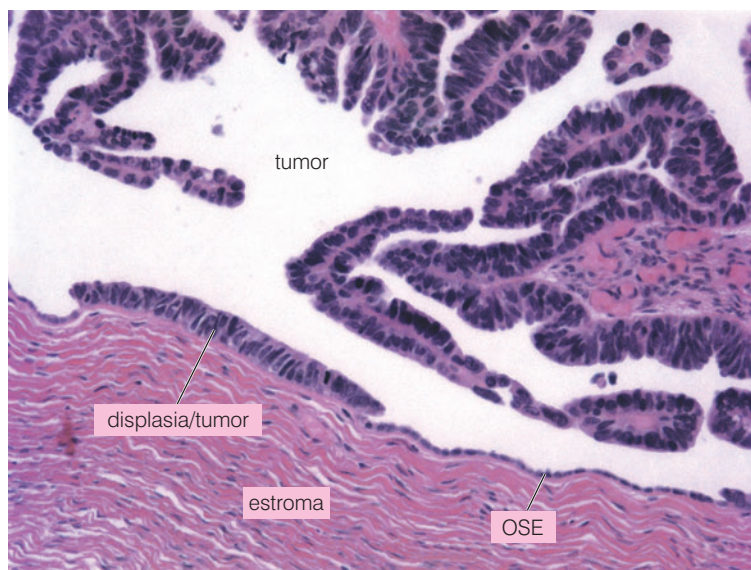


Tabela 9.2 Exemplos de genes-alvo para p53 de acordo com sua função*

Classe de genes	Nome do gene	Função do produto gênico
Antagonista de p53	<i>MDM2/HDM2</i>	induz a ubiquitilação de p53
Genes de bloqueio de crescimento	<i>p21^{Cip1}</i>	inibidor de CDKs, DNA polimerase
	<i>Siach-1</i>	auxilia degradação de β -catenina
	<i>14-3-3σ</i>	seqüestra ciclina B-CDC2 no citoplasma
	<i>Reprimo</i>	interrupção de G ₂
Genes de reparo de DNA	<i>p53R2</i>	ribonucleotídeo redutase – biossíntese de precursores de DNA
	<i>XPE/DDB2</i>	NER global
	<i>XPC</i>	NER global
	<i>XPG</i>	NER, global TCR
	<i>GADD45</i>	NER global?
	<i>DNA pol κ</i>	DNA polimerase com tendência a erros
Reguladores de apoptose	<i>BAX</i>	proteína de poro mitocondrial
	<i>PUMA</i>	proteína de poro mitocondrial BH3-only
	<i>NOXA</i>	proteína de poro mitocondrial BH3-only
	<i>p53AIP1</i>	dissipa o potencial de membrana mitocondrial
	<i>Killer/DR5</i>	receptor de morte da superfície celular
	<i>PIDD</i>	proteína de domínio de morte
	<i>PERP</i>	proteína transmembrana pró-apoptótica
	<i>APAF1</i>	ativador de caspase-9
	<i>NF-κB</i>	fator de transcrição, mediador da sinalização do TNF
	<i>Fas/APO1</i>	receptor de morte
	<i>PIG3</i>	controle da oxidação/redução mitocondrial
	<i>PTEN</i>	reduz os níveis de PIP ₃ antiapoptótica
	<i>Bcl-2</i>	(repressão de) sua expressão
	<i>IGF-1R</i>	(repressão de) sua expressão
	<i>IGFBP-3</i>	proteína seqüestradora de IGF-1
Proteínas antiangiogênicas	<i>TSP-1</i> (trombospondina)	antagonista da angiogênese

* Nesta tabela, a expressão dos genes é induzida por p53, a menos que indicado de outra maneira.

células. (Tal conclusão, porém, não pode ser obtida a partir da análise de um tecido humano que tenha sido recentemente irradiado, pois a radiação também pode provocar a ampla expressão de p53 através de um tecido por dias, ou mesmo semanas, após a radioterapia.) A mesma lógica explica as grandes quantidades de proteína p53 em células infectadas ou transformadas com SV40, nas quais o seqüestro de p53 pelo antígeno “large T” (LT) viral previne a expressão do gene *Mdm2* induzida por p53 e a resultante degradação de p53 (veja a Figura 9.1).

Mdm2 é somente um do grande conjunto de genes cuja expressão é induzida por p53 (Tabela 9.2). Como verificamos na discussão anterior, um outro gene-alvo de grande importância é o *p21^{Cip1}* (algumas vezes chamado *Cdkn1a* em camundongos), que observamos anteriormente como um inibidor de CDK de ampla ação (Seção 8.4). Sua indução explica as ações citostáticas (em vez das pró-apoptóticas) de p53. De fato, o gene que codifica *p21^{Cip1}* foi originalmente descoberto por meio de uma estratégia de procura molecular designada para encontrar genes cuja expressão é aumentada por p53. Logo após sua descoberta, tornou-se evidente que *p21^{Cip1}* atuava como um importante inibidor de uma variedade de cinases dependentes de ciclina (CDKs). Assim, a capacidade de *p21^{Cip1}* de inibir duas CDKs – CDK2 e CDC2 – que estão ativas no fim das fases G₁, S, G₂ e M do ciclo celular, explica como p53 é hábil em bloquear o progresso em muitos pontos nesse ciclo.

Essa informação também proporciona indícios dos papéis fisiológicos realizados por p53 na vida de uma célula. Por exemplo, se o DNA cromossomal de uma célula deveria sofrer algum dano durante a fase G₁ do ciclo celular, p53 se tornaria ativada, tanto pelo rápido aumento de sua concentração como pelas modificações pós-traducionais que lhe permitem atuar efetivamente como um fator de transcrição. Dessa forma, p53 induziria a síntese de *p21^{Cip1}*, e esta, por sua vez, pararia a proliferação celular.

Ao mesmo tempo, componentes da maquinaria de reparo do DNA celular seriam mobilizados para reparar o dano. Alguns destes são diretamente induzidos por p53. Isso é sugerido

por observações de que determinadas proteínas de reparo de DNA são mobilizadas mais efetivamente em células que possuem alelos *p53* tipo selvagem do que naquelas com alelos *p53* mutantes. Por exemplo, células que não possuem *p53* funcional são incapazes de reparar eficientemente as lesões no DNA causadas por benzo(a)pireno (um potente carcinogênico presente em pichos) e os dímeros de pirimidina-ciclobutano causados por radiação ultravioleta (UV). Além disso, a DNA polimerase β , a qual exerce um importante papel na reconstrução das fitas de DNA após bases quimicamente alteradas terem sido retiradas por proteínas de reparo do DNA, é muito menos ativa em células *p53* negativas do que em suas contrapartes tipo selvagem (veja a Tabela 9.2). Retornaremos a essas proteínas de reparo de DNA e seus mecanismos de ação no Capítulo 12.

No momento em que o DNA é reparado com sucesso, os sinais que têm protegido *p53* da destruição desaparecerão. A consequência disso é que os níveis de *p53* entram em colapso e os de *p21^{Cip1}* continuam adaptados. Isso permite a progressão do ciclo celular até o recomeço, permitindo que as células entrem na fase S, na qual ocorrerá a replicação do DNA.

O raciocínio para essa série de passos é simplesmente um: por meio da parada da progressão do ciclo celular em G_1 , *p53* previne a entrada de uma célula na fase S, e, de forma não-intencional, a cópia de DNA ainda não-reparado. Tal processo de cópia, se ocorrido, levaria uma célula a passar seqüências de DNA mutantes a uma ou ambas de suas filhas. A importância dessas ações citostáticas de *p21^{Cip1}* pode ser verificada a partir do fenótipo de camundongos geneticamente modificados nos quais ambas as cópias de linhagem germinativa do gene *p21^{Cip1}* foram inativadas. Apesar de não serem tão tendenciosos a tumores quanto camundongos nulos para *p53*, eles demonstram uma incidência aumentada de tumores mais tarde em sua vida. Esse fenótipo moderado é o que podemos esperar, uma vez que *p21^{Cip1}* medeia algumas, mas não todas, as atividades supressoras de tumor de *p53*.

Caso uma célula que sofreu dano no DNA já tenha avançado para a fase S e, conseqüentemente, esteja no meio da ativa replicação de seu DNA, a proteína *p21^{Cip1}*, induzida por *p53*, pode acoplar a maquinaria da DNA polimerase na forquilha de replicação e parar seu avanço pelas moléculas de DNA molde. (Isso é realizado prevenindo a ativação da DNA polimerase δ , centralmente importante.) Mais uma vez, o objetivo aqui é manter a replicação do DNA em suspensão até que o dano tenha sido reparado com sucesso.

A proteína *p53* ainda utiliza outros genes e proteínas para impor uma parada adicional no avanço do ciclo celular. Por exemplo, *Siah*, o produto de um outro gene induzido por *p53*, participa na degradação de β -catenina; esta auxilia na indução da síntese da ciclina D1 e, assim, na progressão através da maior parte da fase G_1 do ciclo celular (Seção 8.3). A perda de β -catenina também pode causar uma diminuição na transcrição do gene *myc*, o qual, por sua vez, pode retardar a progressão através das diversas fases do ciclo celular em adição a seus efeitos no avanço de G_1 (Seção 8.9).

Dois outros genes que são ativados por *p53* codificam as proteínas 14-3-3 σ e Reprimo (veja a Tabela 9.2), as quais auxiliam a governar a transição G_2/M . A proteína 14-3-3 σ , por sua parte, seqüestra o complexo ciclina B-CDC2 no citoplasma, prevenindo a movimentação deste para o núcleo, onde suas ações são necessárias para direcionar a célula à mitose. Esse mecanismo mantém a mitose em suspensão até que o DNA cromossomal esteja reparado.

Essas várias ações de *p53* têm retratado esta proteína como a “guardiã do genoma”. Pelo fato de prevenir o avanço do ciclo celular e a replicação do DNA enquanto o DNA cromossomal está danificado e pela indução da expressão de enzimas de reparo de DNA, *p53* pode reduzir as taxas nas quais mutações são acumuladas nos genomas celulares. Inversamente, células que apresentam perda da função de *p53* podem proceder na replicação do DNA com dano, ainda não-reparado, podendo causar a elas, por sua vez, genomas relativamente mutáveis, ou seja, genomas que acumulam mutações em um índice anormalmente alto por geração celular. Em situações em que danos graves ao DNA têm sido mantidos (i. e., danos que sobrecarregam as funções de reparo de DNA das células), *p53* pode desencadear apoptose.

Em um experimento particularmente ilustrativo, camundongas prenhas $p53^{+/-}$ que foram cruzadas com machos $p53^{+/-}$ foram tratadas com o carcinógeno altamente mutagênico etilnitrosouréia (ENU). No total, 168 filhotes nasceram. Destes, 70% dos filhotes $p53^{+/-}$ (que foram expostos a esse carcinógeno dentro do útero) desenvolveram tumores cerebrais, 3,6% dos filhotes $p53^{+/-}$ também desenvolveram e nenhum dos nascidos $p53^{+/+}$ mostraram evidências de formação de tumores cerebrais. Portanto, na ausência da função de p53, células fetais que foram mutadas por ENU podem sobreviver e gerar a progênie que forma esses tumores letais.

A ausência de p53 resulta no acúmulo de alterações genômicas muito mais significativas do que mutações pontuais causadas por ENU. Por exemplo, quando fibroblastos de camundongos são desprovidos da função de p53, eles apresentam índices bastante aumentados de perda e duplicação cromossomal (atribuídos, ao menos em parte, à perda de pontos de checagem G_2/M) e também apresentam altos números de *deleções intersticiais*, ou seja, deleções que envolvem a perda de um segmento microscopicamente visível de dentro do braço de um cromossomo.

9.10 p53 freqüentemente conduz para o programa de morte apoptótica

Como indicado diversas vezes neste capítulo, p53 pode optar, sob certas condições, por desencadear uma resposta muito mais drástica do que a parada reversível do avanço do ciclo celular. Em resposta à massiva **anoxia** (privação extrema de oxigênio), dano genômico essencialmente irreparável ou desequilíbrios graves de sinalização, p53 desencadeará a apoptose. Iniciaremos, agora, a exploração do programa apoptótico em mais detalhes.

As mudanças celulares que constituem o programa apoptótico funcionam de acordo com um preciso esquema coordenado. Dentro de minutos, partes da membrana plasmática formam em um filme, a partir de fotos tiradas em diferentes tempos, hérnias para formar estruturas conhecidas como **pústulas**; na verdade, como nos filmes, a superfície celular parece estar fervendo (Figura 9.18A). O núcleo colaba em uma estrutura densa – estado chamado **picnose** (Figura 9.18B) – e fragmenta (Figura 9.18E) à medida que o DNA cromossomal é clivado em pequenos segmentos (Figura 9.18C). Outras mudanças em outras partes da célula também podem ser observadas (Figura 9.18D e E). Finalmente, em geral dentro de uma hora, a célula apoptótica quebra-se em pequenos fragmentos, algumas vezes chamados *corpos apoptóticos*, os quais são rapidamente ingeridos por células vizinhas do tecido ou por macrófagos itinerantes, removendo, assim, todos os traços do que recentemente tinha sido uma célula viva (Figura 9.18F). Uma variedade de procedimentos pode ser utilizada para detectar células apoptóticas dentro de um tecido ou em uma cultura.

A apoptose é executada rotineiramente durante a morfogênese normal com o objetivo de descartar células desnecessárias. Ela serve para descartar populações celulares não-desejadas durante a construção que resulta em tecidos e órgãos bem-formados (Figura 9.19). Camundongos que têm sido geneticamente desprovidos de diversos componentes-chave da maquinaria apoptótica apresentam um conjunto característico de defeitos de desenvolvimento, incluindo excesso de neurônios no cérebro, anormalidades faciais, destruição atrasada do tecido entre os dedos e anormalidades no palato e lentes.

A apoptose também possui um importante papel na fisiologia tecidual normal. No intestino delgado, por exemplo, as células epiteliais são continuamente eliminadas por apoptose, após uma jornada de quatro a cinco dias, desde o fundo das criptas intestinais às pontas das vilosidades que se projetam para dentro do lúmen (veja a Seção 7.11). Durante o desenvolvimento de células sanguíneas vermelhas (o processo de eritropoiese), mais de 95% dos eritroblastos – os precursores das células vermelhas maduras – são eliminados como parte das operações de rotina da medula óssea. Entretanto, no momento em que a taxa de transporte de oxigênio pelo sangue cai abaixo de um certo nível inicial por causa de hemorragia, diversos tipos de anemia ou por baixa tensão de oxigênio no ar, os níveis do hormônio que forma o sangue, eritropoietina (EPO; Barra lateral 5.4), aumentam rapidamente e bloqueiam a apoptose desses precursores de eritrócitos, permitindo a

maturação deles em células sanguíneas vermelhas funcionais. Isso resulta em um rápido aumento da concentração dessas células no sangue.

Um exemplo particularmente dramático da contribuição da apoptose para a fisiologia normal é fornecido pela regressão de células nas glândulas mamárias depois do nascimento da prole. Mais de 90% das células epiteliais nessa glândula, as quais se acumulam em grandes números durante a gravidez para a produção de leite para o recém-nascido, morrem por meio de apoptose durante essa regressão, que é geralmente denominada **involução**.

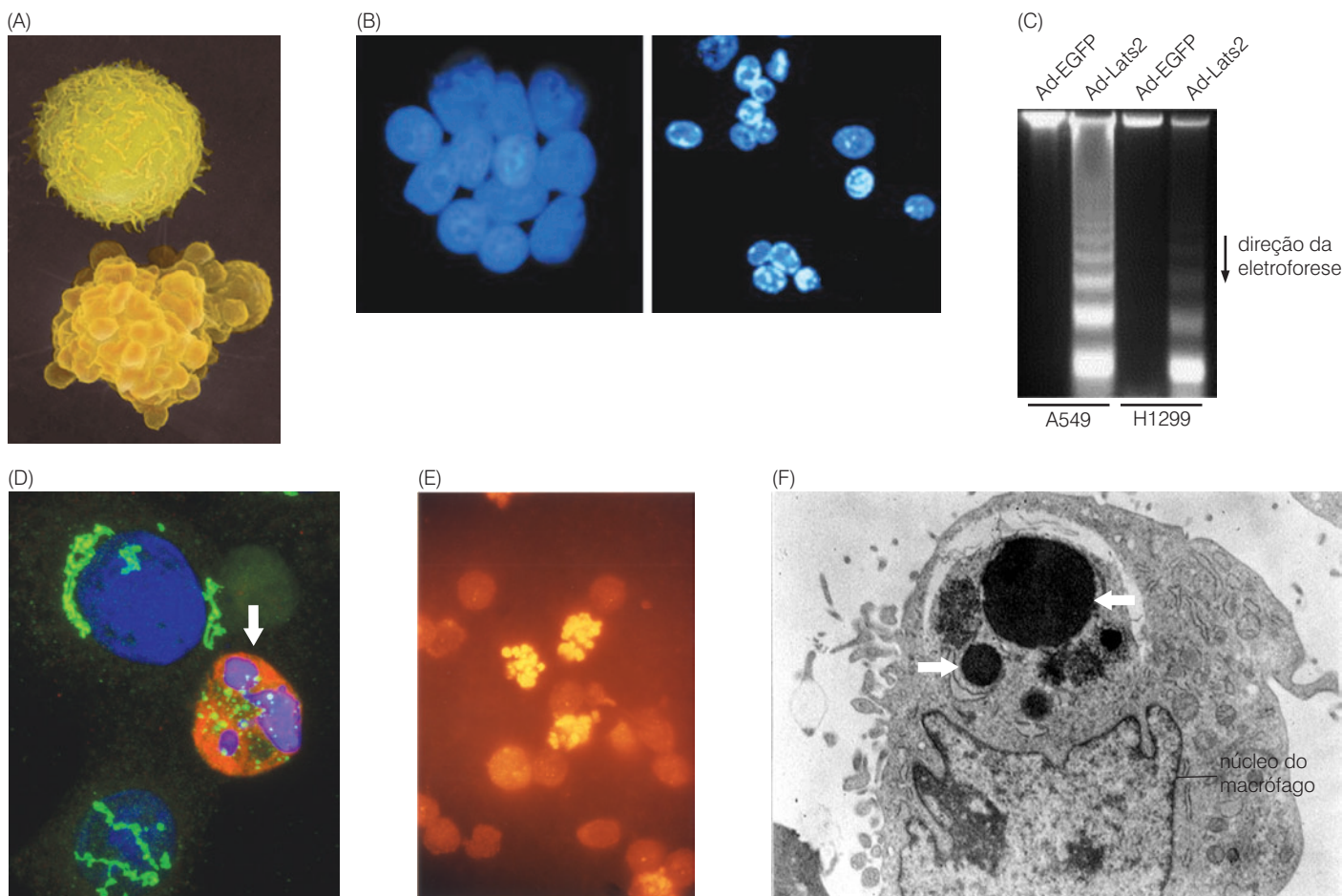


Figura 9.18 Manifestações diversas do programa apoptótico (A) O linfócito situado acima do outro na figura, ambos visualizados por microscopia eletrônica de varredura (SEM), é saudável, enquanto o outro, na parte inferior, entrou em apoptose, resultando nas numerosas pústulas projetadas de sua superfície. (B) Células HeLa – uma linhagem de células humanas de carcinoma cervical – foram fusionadas, resultando na formação de um sincício (*esquerda*). Antes da fusão, algumas dessas células foram tratadas com estaurosporina, uma droga indutora de apoptose. Como consequência, esses núcleos celulares, que normalmente são muito grandes (*esquerda*), sofrem *picnose*, a qual envolve uma condensação da cromatina e um colapso da estrutura nuclear que acompanha apoptose (*direita*). A fragmentação dos núcleos ocorre logo depois disso. (C) Quando a apoptose é induzida, nesse caso por meio da expressão da proteína pró-apoptótica Lats2 (*segunda e quarta canaletas*), o DNA das células A549 e H1299 (*primeira e terceira canaletas*), normalmente de alto peso molecular, é clivado em fragmentos de baixo peso molecular que migram rapidamente por meio de eletroforese em gel, formando uma “escada de DNA”. (D) Os corpos de Golgi (*verde*) são geralmente encontrados em localizações perinucleares em uma célula

normal (*acima, à esquerda*), enquanto em uma célula apoptótica (*seta*), os corpos de Golgi tornaram-se fragmentados. A cromatina está corada de azul, enquanto a PARP clivada, uma proteína nuclear que é clivada durante a apoptose, está imunomarcada em vermelho. (E) Os efeitos bastante variados do programa apoptótico são ilustrados pelo uso de um anticorpo que reage especificamente com moléculas da histona 2B (na cromatina) que são fosforiladas em seus resíduos de serina 14. Esse anticorpo marca os núcleos apoptóticos (que já estão sofrendo fragmentação). As consequências precisas dessa fosforilação na estrutura e função da cromatina permanecem a ser elucidadas. (F) O resultado final da apoptose é a fagocitose dos corpos apoptóticos – fragmentos remanescentes de células apoptóticas – por vizinhos ou por macrófagos. Nesta imagem, os fragmentos nucleares picnóticos de uma célula apoptótica fagocitada são visualizados acima (*setas brancas*) e contrastam com o núcleo normal do macrófago fagocitante (*abaixo*). (A, cortesia de K.G.Murti; B, de K. Andreau *et al.*, *J. Cell Sci.* 117: 5643-5653, 2004; C, de H. Ke *et al.*, *Exp. Cell Res.* 298: 329-338, 2004; D, de J. D. Lane *et al.*, *J. Cell Biol.* 156: 495-509, 2002; E, de W. L. Cheung *et al.*, *Cell* 113: 507-517, 2003; F, cortesia de G. I. Evan.)



Figura 9.19 Apoptose e morfogênese normal As membranas teciduais entre os futuros dedos da pata de um camundongo ainda estão em evidência nesta pata embrionária; elas são preferencialmente marcadas usando o ensaio TUNEL, como indicado pelos numerosos pontos escuros nessas membranas (setas). A apoptose de células que formam as membranas finalmente resulta na formação de dedos que são unidos por membranas apenas próximo à palma. (De Z. Zakeri *et al.*, *Dev. Biol.* 165: 294-297, 1994.)

Em um sentido mais geral, a apoptose é utilizada para manter números apropriados de diferentes tipos celulares em uma ampla variedade de tecidos humanos. A importância desse processo é indicada pelo fato de que a cada ano de nossas vidas, a reciclagem de células – o número que estas são novamente formadas e o número equivalente que são eliminadas – aproxima-se do número total de células ($\sim 3 \times 10^{14}$) presentes no corpo adulto em algum momento. A maioria dessas células rejeitadas parece ser eliminada por apoptose.

A apoptose, que é utilizada para a manutenção tecidual de rotina, não parece depender da função de p53 e é, em vez disso, desencadeada por outros mecanismos que discutiremos posteriormente. Assim, as ações de p53 parecem estar limitadas a situações de emergência, que não são de rotina, que ocasionalmente ameaçam células e, portanto, os tecidos. No contexto específico de patogênese de câncer, como observado anteriormente, o organismo utiliza a apoptose disparada por p53 como uma maneira de remover células que têm potencial para se tornarem neoplásicas, incluindo algumas células que têm sustentado certos tipos de mutações que desregulam o crescimento e outras que têm sofrido dano difundido em seus genomas.

A proteína p53 inicia a apoptose, em parte, por meio de sua habilidade em promover a expressão de diversos genes-alvo *downstream*, os quais especificam componentes da maquinaria apoptótica. Dentre esses, estão os genes que codificam um grupo diverso de proteínas pró-apoptóticas (veja a Tabela 9.2). Ao mesmo tempo, p53 reprime a expressão de genes que especificam proteínas antiapoptóticas. Retornaremos aos detalhes bioquímicos do programa apoptótico e suas relevâncias para a patogenia do câncer na Seção 9.13.

Em suma, as diversas observações citadas indicam que as ações biológicas de p53 agrupam-se em duas categorias principais. Em determinadas circunstâncias, p53 atua de uma maneira citostática para frear o avanço do ciclo celular. Em outras situações, p53 ativa uma maquinaria apoptótica previamente latente da célula, assegurando, desse modo, a morte celular. A escolha feita entre esses dois modos alternativos de ação parece depender do tipo de estresse fisiológico ou dano genético, da gravidade do estresse ou dano, do tipo celular e da presença de outros sinais pró e antiapoptóticos operando em uma célula. Em nível bioquímico, permanece obscuro como p53 decide entre a imposição da apreensão do ciclo celular e o desencadeamento da apoptose.

9.11 A inativação de p53 dá vantagem às células cancerosas incipientes em várias etapas na progressão do tumor

Como veremos no Capítulo 11, a formação de uma célula maligna humana envolve mais da metade de uma dúzia de diferentes etapas que geralmente ocorrem através de muitos anos.

Uma etapa inicial na formação de uma célula cancerosa pode envolver a ativação de um oncogene por meio de algum tipo de mutação. Essa ativação do oncogene pode colocar a célula em grande risco de apoptose induzida por p53. Lembre, por exemplo, o fato de que o oncogene *myc* pode disparar a apoptose dependente de p53. Assim, células que têm adquirido tal oncogene acumulam vantagens adicionais de crescimento pela perda da função de p53.

Posteriormente, no desenvolvimento do tumor, uma população crescente de células tumorais pode sofrer anoxia, pois elas não possuem uma rede de vasos adequada para lhes fornecer o acesso ao oxigênio carreado pelo sangue. Enquanto células normais morreriam em virtude de tal privação de oxigênio, as células tumorais podem sobreviver, pois seus antepassados coordenaram a inativação do gene *p53* durante um estágio inicial de desenvolvimento tumoral (tendo feito isso por uma razão completamente diferente).

Durante grande parte desse longo processo de múltiplas etapas da progressão de tumor, a ausência de respostas aos danos genéticos, desencadeadas por p53, permitirá a sobrevivência de células que estão acumulando mutações em uma taxa mais alta do que o normal. Essa elevada mutabilidade aumenta a taxa na qual oncogenes se tornam ativos e os genes supressores de tumor inativados; a taxa total de evolução de células pré-malignas para um estado maligno é, desse modo, acelerada. O colapso do telômero, outro perigo enfrentado pela evolução de células pré-malignas (veja o Capítulo 10), também seleciona para aquelas células que têm perdido sua resposta de dano ao DNA dependente de p53.

As vantagens da perda de função de p53 para as células tumorais incipientes não param por aqui. Um dos importantes genes-alvo cuja expressão é aumentada por p53 é o gene *TSP-1*, que específica trombospodina-1. Como veremos mais tarde no Capítulo 13, Tsp-1 é uma proteína secretada que atua no espaço extracelular para bloquear o desenvolvimento de vasos sanguíneos. Conseqüentemente, uma redução na expressão de Tsp-1, seguida pela perda de p53, remove um importante obstáculo que de outra forma poderia prevenir que conjuntos de células cancerosas desenvolvessem um suprimento sanguíneo adequado durante as fases iniciais do desenvolvimento tumoral.

Juntas, essas diversas conseqüências da inativação de p53 ilustram dramaticamente como o mau funcionamento de um único componente do circuito de respostas-alarme permite que as células cancerosas adquiram múltiplas alterações e sobrevivam sob condições que geralmente levariam à morte de células normais. Esses múltiplos benefícios que se acumulam para as células cancerosas explicam por que a via de p53 está danificada na maioria, senão todos, dos tipos de tumores humanos.

Em quase metade desses tumores, a própria proteína p53 está danificada por mutações na fase de leitura do gene *p53* (veja a Figura 9.4). Em muitos dos tumores restantes, a proteína ARF está ausente ou a proteína Mdm2 está superexpressa. Além disso, a função de p53 pode ser comprometida por defeitos na complexa rede de sinalização na qual p53 e seu antagonista, Mdm2, estão encaixados. Existem razões para suspeitar que outros mecanismos genéticos ainda desconhecidos subvertam a função de p53. Enquanto o organismo como um todo se beneficia muito da guardiã p53 postada em suas miríades de células, ele sofre gravemente, uma vez que a função de p53 é perdida em alguma delas, pois as células p53 negativas resultantes estão livres para iniciar a longa marcha para a malignidade.

9.12 Alelos mutantes herdados que afetam a via de p53 predisõem a uma variedade de tumores

Em 1982, um grupo de famílias foi identificado por apresentar uma elevada suscetibilidade a uma variedade de diferentes tumores, incluindo glioblastoma; leucemias; carcinomas de mama, pulmão e pâncreas; tumor de Wilms; e sarcomas de tecido mole (Figura 9.20). Em alguns parentes, assim como na metade dos membros, ocorreu um ou outro desses cânceres, e dois

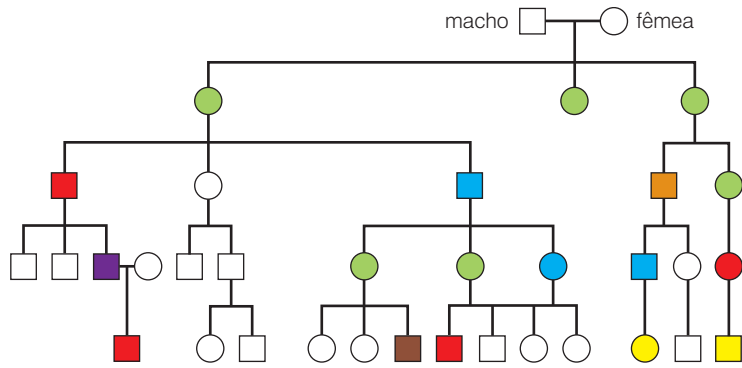


Figura 9.20 Suscetibilidade ao câncer familiar devido a alelos *p53* mutantes de linhagem germinativa. Esta característica de uma família que sofre de síndrome de Li-Fraumeni revela uma variedade de distintos cânceres que alcançam níveis elevados de incidência. A diversidade de tipos de câncer sofridos por membros de famílias Li-Fraumeni contrasta com a maioria das síndromes cancerosas familiares, nas quais um único tipo de câncer é geralmente observado ocorrer em elevada frequência. Membros das famílias desenvolveram as seguintes malignidades: câncer de mama (verde), glioblastoma (amarelo), leucemia (roxo), câncer de pulmão (azul), carcinoma pancreático (laranja), sarcoma (vermelho); tumor de Wilms (marrom); machos (quadrados), fêmeas (círculos). (De F. P. Li e J. F. Fraumeni, *J. Am. Med. Assoc.* 247: 2692-2694, 1982.)

terços destes desenvolveram algum tipo de câncer até atingirem 22 anos. Alguns membros das famílias foram afetados com diversos tipos de câncer simultaneamente.

Essa síndrome cancerosa familiar, chamada Li-Fraumeni, conforme os dois geneticistas que primeiro a identificaram e caracterizaram, é mais incomum, uma vez que causa suscetibilidade a uma ampla variedade de cânceres. Lembre o comportamento completamente contrastante das outras síndromes cancerosas familiares que encontramos no Capítulo 7. Alelos mutantes de linhagem germinativa da maioria dos genes supressores de tumor tipicamente aumentam a suscetibilidade a uma restrita ordem de tipos de câncer (veja a Tabela 7.1).

Em 1990, oito anos após a primeira descrição da síndrome de Li-Fraumeni, pesquisadores descobriram que muitos dos casos foram devidos a um alelo mutante em um loco do Cromossomo humano 17p13 – precisamente onde o gene *p53* está localizado. Em cerca de 70% dessas famílias multicancerosas, foi observado que os alelos *p53* mutantes eram transmitidos de uma maneira mendeliana. Membros de famílias que herdaram um alelo *p53* mutante apresentaram uma alta probabilidade de desenvolver alguma forma de malignidade frequentemente cedo na vida. Observou-se que a idade do início dessas diversas malignidades era completamente variável: em torno de 5 anos de idade para carcinomas adrenocorticais, 16 anos para sarcomas, 25 anos para tumores cerebrais, 37 anos para câncer de mama e quase 50 anos para câncer de pulmão. Na inspiração dos diversos papéis que *p53* realiza na supressão do risco de câncer nas células pelo corpo, parece razoável que alelos mutantes de linhagem germinativa desse gene pudessem predispor uma pessoa a tal grupo diverso de malignidades. (Uma intrigante exceção é fornecida por raras mutações de linhagem germinativa de *p53* que conferem uma predisposição a somente um restrito conjunto de tipos de câncer; veja a Barra lateral 9.5).

Agora sabemos que os alelos *p53* mutantes que são transmitidos através das linhagens germinativas de famílias Li-Fraumeni carregam uma variedade de mutações pontuais que estão dispersas pela fase de leitura de *p53*, com uma distribuição que lembra aquela apresentada por mutações somáticas que têm sido documentadas em mais de 15 mil genomas tumorais (veja a Figura 9.6B). A análise do espectro de mutações de linhagem germinativa tem demonstrado uma predominância de transições G:C para A:T em sítios CpG – precisamente aquelas que ocorreriam se uma 5-metilcitosina fosse submetida a uma deaminação espontânea, causando sua substituição por uma timidina.

Provocativamente, uma síndrome cancerosa familiar que se comporta muito mais como uma síndrome Li-Fraumeni tem sido descoberta em famílias que herdaram formas mutantes defeitivas da Chk2 cinase, a qual é responsável pela fosforilação de *p53*, salvando esta da destruição e, assim, ativando a maquinaria de alarme de *p53* (veja a Figura 9.13). Um alelo mutante de linhagem germinativa do gene *Chk2* está presente em 1,1 a 1,4% das populações ocidentais e em percentagens maiores (como 5%) em conjuntos de pacientes com câncer de mama. Isso sugere que a herança de um alelo *Chk2* mutante confere um risco mensuravelmente aumentado de desenvolver essa malignidade. Outra síndrome relacionada com predisposição ao câncer deriva de uma alteração no promotor do gene *MDM2*.

Barra lateral 9.5 Alelos *p53* mutantes causam tumores altamente específicos

Alguns alelos *p53* mutantes de linhagem germinativa têm efeitos que são completamente diferentes daqueles observados tipicamente em famílias Li-Fraumeni. Um desses exemplos incomuns tem sido relatado no sul do Brasil, onde carcinomas adrenocorticais pediátricos (afetando o córtex das glândulas adrenais, as quais se localizam acima dos rins) são encontrados em taxas que são de 10 a 15 vezes maiores do que aquelas encontradas em outras partes do mundo. Notavelmente, de 36 pacientes dessa região que foram examinados, 35 apresentaram uma mutação idêntica de linhagem germinativa no gene *p53*, que causou uma substituição arginina → histidina no resíduo de aminoácido 337. Essa observação é difícil de conciliar com a atual pré-concepção de que alelos *p53* herdados deveriam afetar uma variedade de tecidos pelo corpo. Entretanto, recentes esforços para caracterizar os efeitos dessa substituição de aminoácido na estrutura de *p53* têm mostrado que o domínio de tetramerização da proteína mutante (veja a Figura 9.7A) é menos estável do que o da proteína *p53* tipo selvagem e é sensível à quebra em pH ácido – precisamente o ambiente encontrado dentro da glândula adrenal. Esse fato pode contribuir para os efeitos tecido-específicos peculiares desse alelo mutante de linhagem germinativa.

9.13 A apoptose é um complexo programa que, por diversas vezes, depende da mitocôndria

Muitos consideram a perda completa de um programa apoptótico funcional ser uma das marcas de todos os tipos de células humanas malignas. Até o momento, entretanto, nossas descrições de apoptose não têm feito jus a esse programa suicida e ao seu papel na patogênia tumoral. Assim, revisaremos a apoptose e a exploraremos em maior profundidade.

Já vimos que a iniciação da apoptose por p53 representa um importante mecanismo pelo qual tecidos podem eliminar células irreparavelmente danificadas ou que funcionam de forma aberrante. De forma importante, como verificamos anteriormente, a apoptose também pode ser iniciada por meio de uma variedade de canais de sinalização que não dependem das ações de p53. Um exemplo disso, em particular, é verificado na Figura 9.21: a perda de ligação de uma célula à matriz extracelular dispara a *anoikis*, a forma especializada de apoptose que ocorre sem a intervenção de p53. Isso sugere um tema maior – que p53 é somente um dos muitos participantes do programa apoptótico, e a inativação da função de p53 é somente uma das maneiras pelas quais células cancerosas escapam da apoptose.

A primeira indicação de contribuições de outras proteínas à regulação da apoptose veio de uma exploração da função do oncogene *bcl-2* (gene do linfoma de célula B – 2). Assim como muitos genes associados a câncer encontrados nos genomas de tumores hematopoiéticos humanos, a versão oncogênica do gene *bcl-2* é formada por meio de uma translocação cromossomal recíproca, na qual porções dos braços dos cromossomos humanos 14 e 18 são trocadas. No ponto de quebra, onde os braços translocados são unidos nas células de linfoma de células B foliculares humanas, a fase de leitura do gene *bcl-2* é colocada sob o controle de um promotor que dirige sua alta expressão constitutiva.

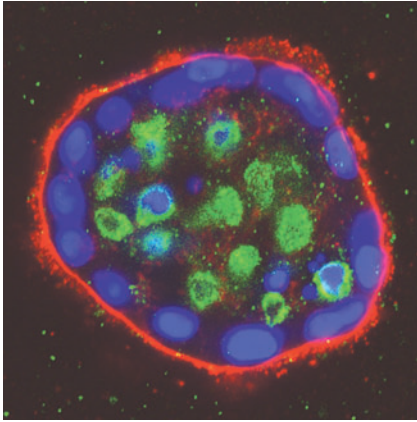


Figura 9.21 *Anoikis* disparada pela perda de ligação à matriz extracelular. A suspensão de células epiteliais mamárias (MECs) humanas imortalizadas, mas não tumorigênicas, em um meio de proteínas de matriz extracelular força essas células a crescerem de uma maneira independente de ligação, ou seja, sem a ligação a um substrato sólido. Essas MECs (*grandes núcleos azuis*) fazem sua ligação por meio de integrinas (*vermelho*) às proteínas de matriz extracelular (ECM) presentes no meio circundante; isso possibilita que as células evitem o programa apoptótico denominado *anoikis*. Entretanto, células no meio dessa colônia celular esférica não são capazes de ligarem-se por si próprias a essas moléculas ECM e assim ativarem *anoikis*. (Cortesia de J. Debnath e J. Brugge.)

Quando tal oncogene *bcl-2* foi inserido como um transgene em uma linhagem germinativa de camundongos sob condições que asseguravam sua expressão em células precursoras de linfócitos, nenhum efeito foi observado na sobrevivência a longo termo desses animais transgênicos (Figura 9.22A, B). Por outro lado, a expressão de um transgene *myc* oncogênico nessas células levou a linfomas e à morte de metade dos camundongos dentro de dois meses após o nascimento. A concomitante expressão dos dois transgenes (alcançada pelo cruzamento do camundongo transgênico *bcl-2* com o transgênico *myc*), entretanto, resultou em uma prole que apresentou uma taxa de morte ainda mais rápida, com todos os camundongos tendo morrido em menos de dois meses após o nascimento (veja a Figura 9.22B).

A incapacidade de *bcl-2*, por si própria, de desencadear a formação de tumor vai de encontro a sua ação como um oncogene típico, por exemplo, como um oncogene como *myc* que emite sinais promotores de crescimento potentes. O estudo cuidadoso das populações de linfócitos em camundongos que carregam somente o transgene *bcl-2* indicou que os efeitos deste gene em células foram, na verdade, completamente diferentes daqueles de *myc* ou *ras*: *bcl-2* prolongou a vida de linfócitos que eram destinados a morrer rapidamente de outra maneira. Assim, quando células linfóides B, desses camundongos transgênicos, foram cultivadas *in vitro*, elas apresentaram uma notável extensão do tempo de vida. *In vivo*, as células linfóides nas quais *bcl-2* estava sendo expressa acumularam *bcl-2* em quantidades diversas vezes acima do normal, porém significativamente essas células não proliferaram ativamente, explicando a ausência de um tumor hematopoiético em camundongos que carregam somente o transgene *bcl-2*.

O oncogene *myc*, quando agindo por si próprio, atuou como um potente mitógeno, porém seus poderes estimulatórios de crescimento foram atenuados por seus efeitos indutores de morte, que descrevemos anteriormente neste capítulo (Seção 9.7). Entretanto, *myc* e *bcl-2*, quando atuando em conjunto, criaram uma malignidade agressiva da linhagem de linfócito B; *myc* direcionaria a rápida proliferação celular e seus efeitos indutores de morte acompanhantes seriam neutralizados pelas ações de prolongação do tempo de vida de *bcl-2*. Desde esses experimentos iniciais, exemplos mais dramáticos de sinergia entre *myc* e oncogenes como *bcl-2* têm sido relatados (p. ex., Figura 9.22C). (Note que essas dinâmicas abrem um paralelo que discutimos nas Seções 9.7 e 9.8, em que os efeitos indutores de morte de *myc* foram cortados pela inativação do gene *p53*.)

Esse trabalho sobre *bcl-2* logo convergiu em pesquisa sobre apoptose. Apesar do programa apoptótico ter sido reconhecido como um fenômeno biológico normal em tecidos animais por histologistas do século XIX, ele foi redescoberto e descrito com uma precisão muito maior no ano de 1972. Antes de sua redescoberta, pensava-se que células em tecidos de metazoários eram eliminadas somente por meio de **necrose**. Como indicado na Tabela 9.3, esses dois processos de morte são, na verdade, completamente diferentes. No final dos anos 1980, uma pesquisa sobre a genética de desenvolvimento de um verme (a espécie *Caenorhabditis elegans*) revelou que a apoptose é explorada para eliminar diversos tipos celulares como parte do programa de desenvolvimento normal desses minúsculos animais (veja também a Figura 10.1). Isso levou ao reconhecimento de que a apoptose é um processo biológico básico que é comum em todos os metazoários.

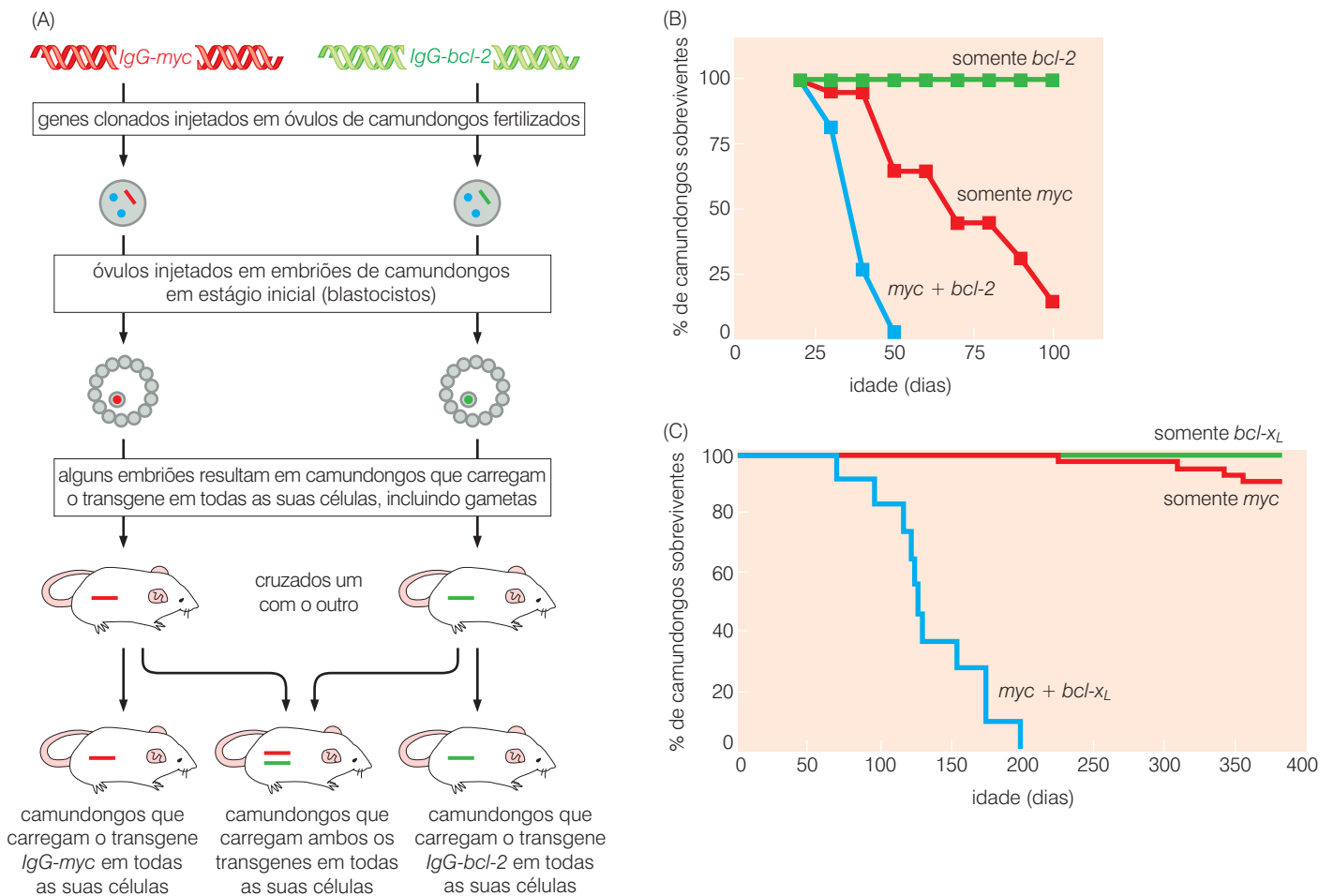


Figura 9.22 Ações dos genes antiapoptóticos similares a Bcl-2 (A) Clones dos genes *myc* e *bcl-2* foram construídos onde cada gene foi colocado sob o controle de um promotor genético de anticorpo (*IgG*). Esse promotor assegurou que ambos os genes fossem expressos especificamente em células da linhagem linfócito B. Cada gene foi então introduzido na linhagem germinativa de um camundongo como mostrado, resultando, em cada caso, em um *transgene*. (B) Camundongos que carregavam o transgene *IgG-bcl-2* não apresentaram aumento na mortalidade (*quadrados verdes*). Em contraste, o transgene *myc* levou a uma mortalidade bastante aumentada proveniente de linfomas, com quase todos os animais morrendo dessa doença com 100 dias de vida (*quadrados vermelhos*). Entretanto, quando ambos os transgenes, *bcl-2* e *myc*, estavam presentes na linhagem germinativa dos camundongos, a formação dos linfomas foi bastante acelerada, com, virtualmente, todos os animais sucumbindo à doença em 50 dias de vida (*quadrados azuis*). (C) Um resultado mais

dramático foi observado anos depois, quando duas cepas de camundongos transgênicos foram desenvolvidas e expressavam os oncogenes *myc* ou o *bcl-x_L* especificamente nos linfócitos celulares plasmáticos (secretores de anticorpos) do sistema imune. (*bcl-x_L* é um "primo" de *bcl-2* que atua de forma similar a este.) Camundongos normais e camundongos transgênicos, que carregavam somente o transgene *bcl-x_L*, sobreviveram por mais de um ano sem qualquer desenvolvimento de tumor (*linha verde*); similarmente, animais transgênicos expressando um transgene *myc* apresentaram-se bastante saudáveis até cerca de 10 meses de vida, quando um pequeno número deles desenvolveu tumores de células plasmáticas. Entretanto, quando as duas cepas foram cruzadas, a cepa dupla-transgênica desenvolveu tumores de células plasmáticas rapidamente, iniciando em torno de 75 dias de vida, e todos os animais morreram desses tumores em 200 dias de vida. (B, de A. Strasser *et al.*, *Nature* 348: 331-333, 1990; C, de W.C. Cheung *et al.*, *J. Clin. Invest.* 113: 1763-1773, 2004.)

Tabela 9.3 Apoptose versus necrose

	Apoptose	Necrose
Estímulo desencadeador	remodelagem tecidual programada manutenção do tamanho do pool celular dano genômico confusão metabólica hipoxia desequilíbrios nas vias de sinalização	estresse metabólico ausência de nutrientes mudanças no pH, temperatura hipoxia, anoxia
Mudanças morfológicas		
Células afetadas	células individuais	grupos de células
Volume celular	diminuído	aumentado
Cromatina	condensada	fragmentada
Lisossomos	não-afetados	anormais
Mitocôndria	morfologicamente normal de início	morfologicamente aberrante
Resposta inflamatória	nenhuma	acentuada
Evento celular	corpos apoptóticos consumidos por células vizinhas	lise
Mudanças moleculares		
Atividade genética	requerida para o programa	desnecessária
DNA cromossomal	clivado em sítios específicos	clivagem aleatória
Cálcio intracelular	aumentado	não-afetado
Bombas iônicas	funcionantes	perdidas

Adaptada de R.J.B. King, *Cancer Biology*, 2ª edição. Harlow, UK: Person Education, 2000.

Uma vez que o programa apoptótico foi compreendido claramente, o papel da oncoproteína Bcl-2 na patogênese do câncer tornou-se aparente. Ela opera mais como um agente antiapoptótico do que como um mitógeno. Assim, Bcl-2 atua de uma maneira precisamente oposta à p53. Bcl-2 bloqueia a apoptose, enquanto p53 a promove. Colocado em termos genéticos, a ativação do oncogene *bcl-2* e a inativação de *p53* conferem benefícios similares (porém dificilmente idênticos) em células cancerosas, em que ambos reduzem a probabilidade de ativação do programa apoptótico.

Cuidadasas investigações bioquímicas e biológicas celulares finalmente revelaram o sítio intracelular da ação de Bcl-2. Observou-se que ela atuava em um local intracelular mais inesperado – a membrana externa da mitocôndria (Figura 9.23). Em primeiro lugar, essa descoberta fez pouco sentido, uma vez que se pensava que a mitocôndria era especializada somente em uma tarefa, que era de gerar energia para a célula na forma de ATP. Como um subproduto dessa produção de energia, a mitocôndria era também conhecida por produzir metabólitos de glicose que são utilizados na biossíntese de algumas das diversas espécies bioquímicas da célula.

Logo, entretanto, o papel da mitocôndria no programa apoptótico foi esclarecido. O Citocromo *c*, o ator central nesse processo, normalmente reside no espaço entre as membranas interna e externa da mitocôndria (veja a Figura 9.23B), onde ele atua na transferência de elétrons como parte da fosforilação oxidativa. Entretanto, quando determinados sinais disparam o início da apoptose, a membrana mitocondrial externa torna-se despolarizada (i. e., perde seu gradiente normal de carga) e o citocromo *c* é secretado da mitocôndria para o citosol circundante (Figura 9.24). Uma vez presente no citosol, o citocromo *c* associa-se a outras proteínas para desencadear a cascata de eventos que resultará na morte apoptótica. Então, a oficina na qual o volume da energia celular é produzido foi selecionada em algum ponto durante a evolução celular eucariótica para uma função completamente diferente – portar e liberar um mensageiro bioquímico que desencadeia as mudanças que levam à morte celular.

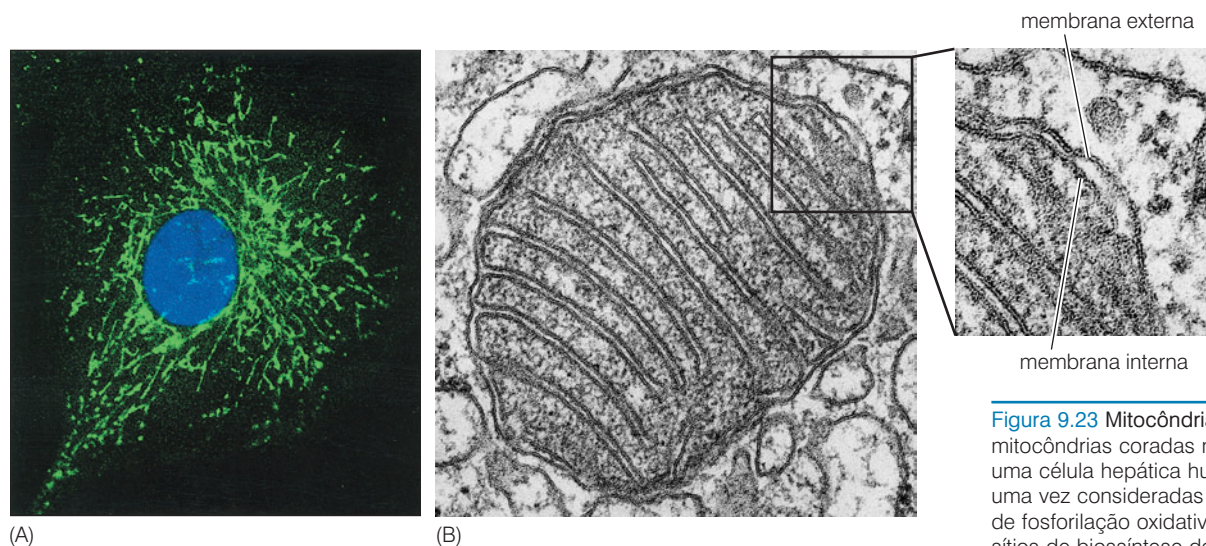


Figura 9.23 Mitocôndria (A) As mitocôndrias coradas no citoplasma de uma célula hepática humana (verde) foram uma vez consideradas apenas como sítios de fosforilação oxidativa assim como os sítios de biossíntese de certos metabólitos-chave. A descoberta da capacidade delas em regular a apoptose por meio da liberação do citocromo *c* forçou uma maior indagação de seu papel na vida de uma célula. (B) O citocromo *c* é estocado no espaço entre a membrana mitocondrial mais externa e as membranas internas, onde ele normalmente desempenha um importante papel no transporte de elétrons. Os canais na membrana externa que permitem a sua liberação para o citosol durante a apoptose não são visualizados aqui. (A, cortesia de L.B. Chen; B, cortesia de D.S. Friend.)

Agora sabemos que a proteína Bcl-2 é um membro de uma extensa e complexa família de proteínas (Figura 9.25) que controla o fluxo do citocromo *c* por meio de canais especializados na membrana externa da mitocôndria. Mais especificamente, esses canais regulam, ou não, o citocromo *c* e diversas outras proteínas (as quais normalmente residem no espaço entre as membranas interna e externa da mitocôndria) que são liberadas da mitocôndria para o citosol. Alguns membros da família de proteínas de Bcl-2, incluindo esta e Bcl-X_L, trabalham para manter esses canais fechados e, assim, manter o citocromo *c* preso na mitocôndria.

Ainda outras “parentes” de Bcl-2, como Bax, Bad, Bak, e Bid (veja a Figura 9.25), atuam de forma oposta, lutando para manter esse canal aberto. Bax é codificada por um gene cuja transcrição é sabidamente ativada por p53; suas ações começam a explicar como p53 realiza a indução de apoptose. Bad pode ser fosforilada por Akt/PKB, que diminui a capacidade de Bad de segurar o canal mitocondrial em uma configuração aberta; isso explica um pouco do efeito antiapoptótico da Akt/PKB cinase.

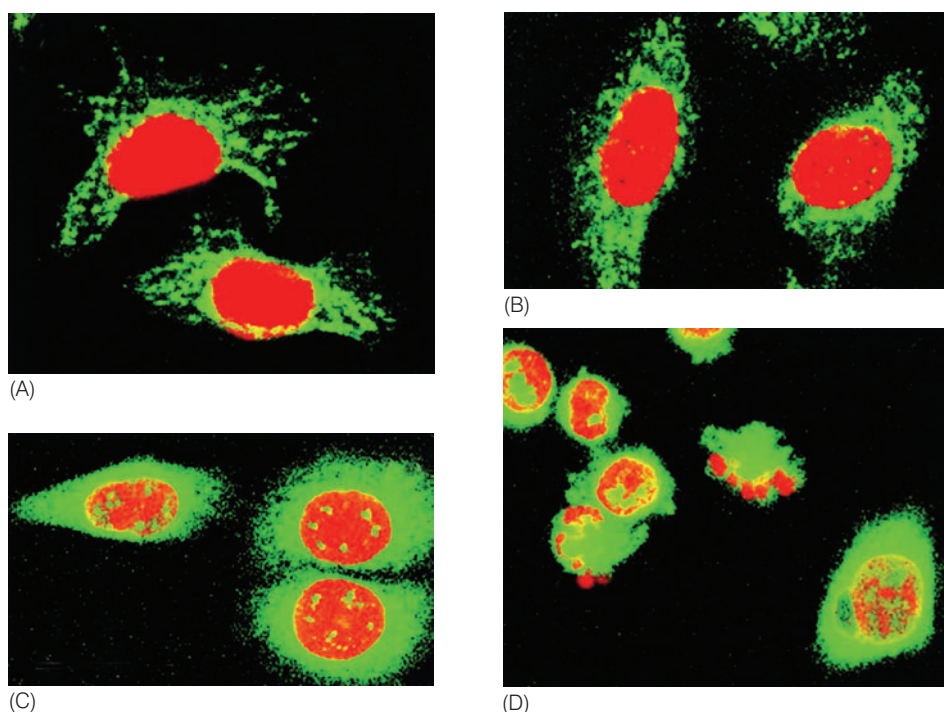
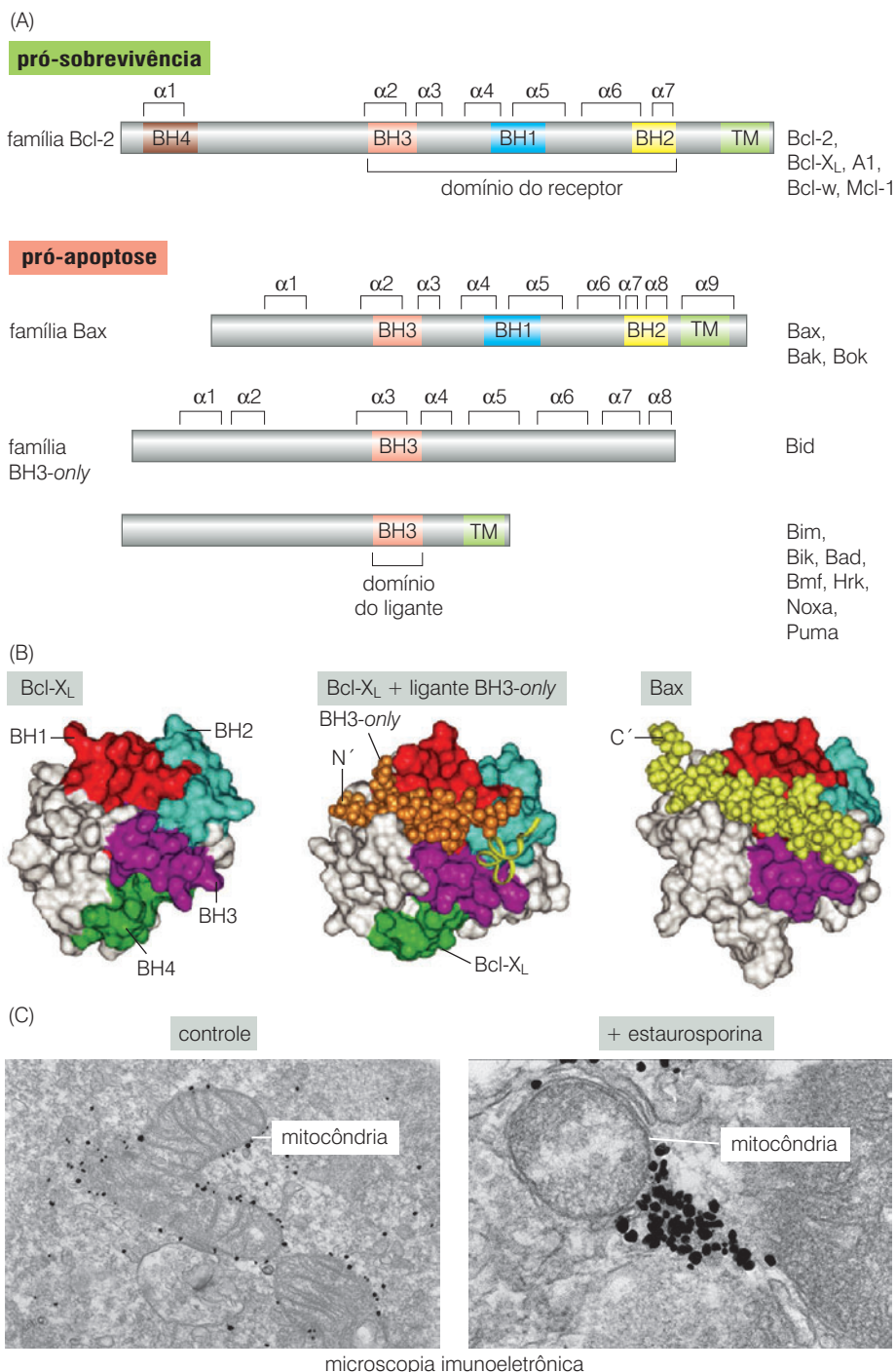


Figura 9.24 Liberação do citocromo *c* da mitocôndria para o citosol A presença de citocromo *c* pode ser detectada por marcação com um anticorpo específico fluorescente (verde), que contrasta com os núcleos marcados com corante (laranja). (A) Inicialmente, a distribuição de citocromo *c* coincide com a distribuição de mitocôndria no citoplasma. À medida que a apoptose ocorre (B, C, D), entretanto, a coloração do citocromo *c* torna-se cada vez mais uniforme no citoplasma, já que este é liberado da mitocôndria. Ao mesmo tempo, alguns núcleos dão evidências de fragmentação que está associada à apoptose (C, D). (De E. Bossy-Wetzel *et al.*, *EMBO J.* 17: 37-49, 1998.)

Figura 9.25 Bcl-2 e proteínas relacionadas (A) A proteína Bcl-2 é um membro de uma extensa família de proteínas que desempenha diversos papéis na prevenção da apoptose (*superior*) ou na promoção desta (*inferior*). Essas proteínas possuem em comum um domínio BH3 (*rosa*), com algumas, como a própria Bcl-2, tendo os domínios BH1 e BH2 adicionais indicados aqui (*azul*, *amarelo*). Diversas delas também possuem domínios transmembrana (TM) (*verde-claro*) para a ligação na membrana e domínios BH4 (*marrom*) de função desconhecida. As proteínas pró-apoptóticas são subgrupadas naquelas da família "Bax", as quais possuem vários domínios que são homólogos aos domínios de Bcl-2; enquanto isso, a família de proteínas BH3-only possui somente o domínio BH3 que está presente em Bcl-2. Membros da família Bax normalmente permanecem na forma inativa na membrana mitocondrial externa ou no citosol, enquanto membros inativos da família BH3-only normalmente são limitados ao citosol; ambos são ativados e/ou translocados à mitocôndria por meio de sinais pró-apoptóticos. (B) A proteína antiapoptótica Bcl-X_L (*esquerda*) é apresentada com seus domínios BH1 (*vermelho*), BH2 (*verde azulado*), BH3 (*lilás*) e BH4 (*verde*). Quando uma proteína BH3-only pró-apoptótica (*laranja*, *no centro*) liga-se à Bcl-X_L, uma hélice- α dessa proteína BH3 liga-se na fenda de Bcl-X_L, ficando entre seus domínios BH1 e BH3, inibindo, assim, esta proteína. Bax, uma outra proteína pró-apoptótica (*direita*), dobra sua cauda C-terminal α -helicoidal (*amarelo*) para dentro de sua própria fenda (i. e., formando um complexo intramolecular). (Note que a orientação N' para C' dessa cauda é oposta àquela da proteína BH3-only ligada à Bcl-X_L.) Os mecanismos precisos pelos quais essas diversas moléculas regulam a abertura do canal da membrana mitocondrial permanecem desconhecidos. (C) Bax é normalmente encontrada no citosol (*não-visível*), enquanto Bak é ligada à membrana mitocondrial externa (*pontos pretos, quadro esquerdo*). Com o início da apoptose após o tratamento das células com a droga estaurosporina (STS), milhares de moléculas de Bak (*pontos-pretos*) coalescem junto com Bax (*não-mostrado*) nos focos em forma de pontos na superfície mitocondrial (*quadro direito*). Esses conjuntos participam da fragmentação mitocondrial observada durante a apoptose, e essa fragmentação parece contribuir para a liberação do citocromo c dos espaços entre as membranas interna e externa da mitocôndria. (A e B, de S. Cory e J.M. Adams, *Nat. Ver. Câncer* 2: 647-656, 2002; C, de A. Nechushtan *et al.*, *J. Cell Biol.* 153: 1265-1276, 2001.)

Com o prosseguimento da apoptose, grandes complexos de proteínas Bax e Bak agregam-se na superfície externa da mitocôndria, onde participam, de maneiras ainda desconhecidas, da fragmentação dessa organela (Figura 9.25C). Isso parece resultar na liberação adicional de proteínas pró-apoptóticas para o citosol e em um total colapso de uma maquinaria geradora de ATP primário da célula. Ao todo, sabe-se que o genoma humano codifica vinte e quatro proteínas relacionadas à Bcl-2; seis dessas são anti-apoptóticas, enquanto as dezoito restantes são pró-apoptóticas.

Esses níveis relativos das proteínas pró e antiapoptóticas dentro de cada canal determina se o citocromo c permanecerá retido na mitocôndria ou será liberado. Desse modo, o canal da membrana mitocondrial determina a vida ou a morte de uma célula. Por exemplo, camundongos que têm sido privados de ambas as cópias de linhagem germinativa do gene antiapoptótico *Bcl-2*



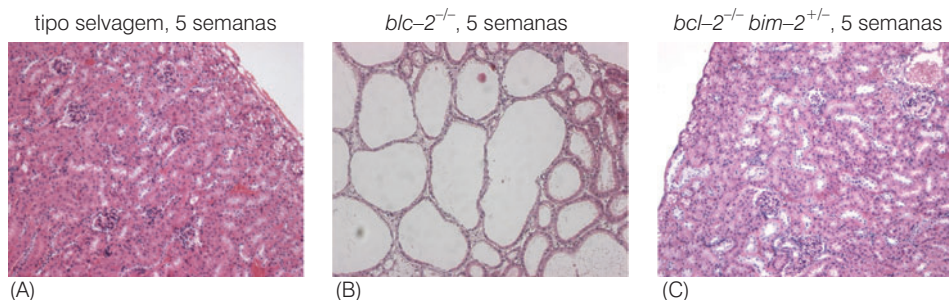


Figura 9.26 O delicado balanço entre proteínas pró e antiapoptóticas (A) O rim de um camundongo tipo selvagem é um tecido bem-consolidado em cinco semanas de vida. (B) Entretanto, a deleção de ambas as cópias de linhagem germinativa do gene antiapoptótico *bcl-2* (i. e., genótipo *bcl-2*^{-/-}) resulta em uma apoptose difundida e doença renal policística nessa idade. (C) Esses efeitos podem ser completamente revertidos se uma cópia do gene pró-apoptótico *bim* é deletada da linhagem germinativa (i. e., genótipo *bcl-2*^{-/-} *bim*^{+/-}). (C, de P. Bouillet *et al.*, *Dev. Cell* 1: 645-654, 2001.)

sofrem de falha renal e colapso imune devido à morte apoptótica difundida das células nesses tecidos; esses fenótipos letais podem ser evitados por meio da deleção adicional, a partir de suas linhagens germinativas, de somente uma cópia do gene pró-apoptótico, “primo” de *Bcl-2*, chamado *bim* (Figura 9.26). Isso ilustra, em tecidos como esses, o fato de células individuais serem governadas pelo delicado equilíbrio entre as proteínas similares a *Bcl-2* pró e antiapoptóticas.

Essas constatações não fornecem nenhuma indicação de por que as células de mamíferos expressam tantas proteínas distintas similares a *Bcl-2*. Nesse exemplo, importantes indícios vieram a partir de estudos indicando que diversos estímulos fisiológicos celulares atuam por meio de diferentes proteínas relacionadas à *Bcl-2* para ativar proteínas pró-apoptóticas, as

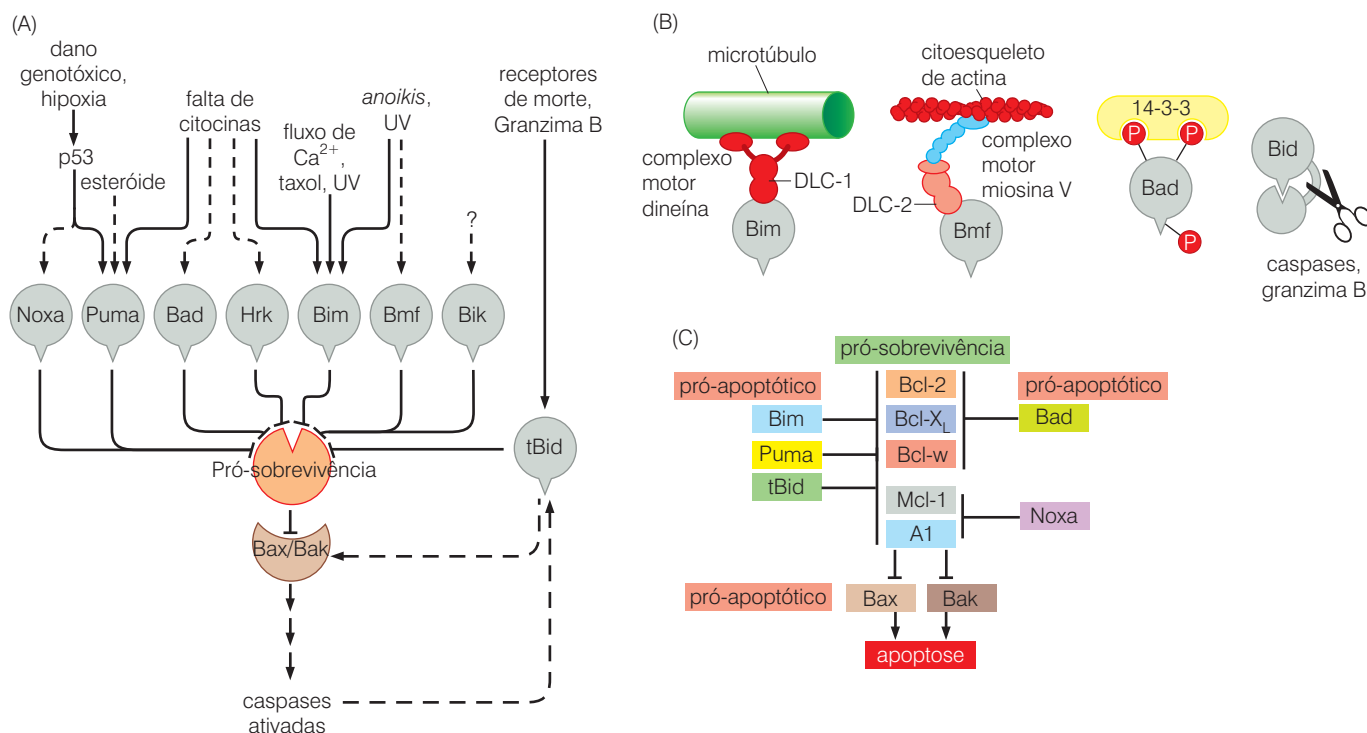
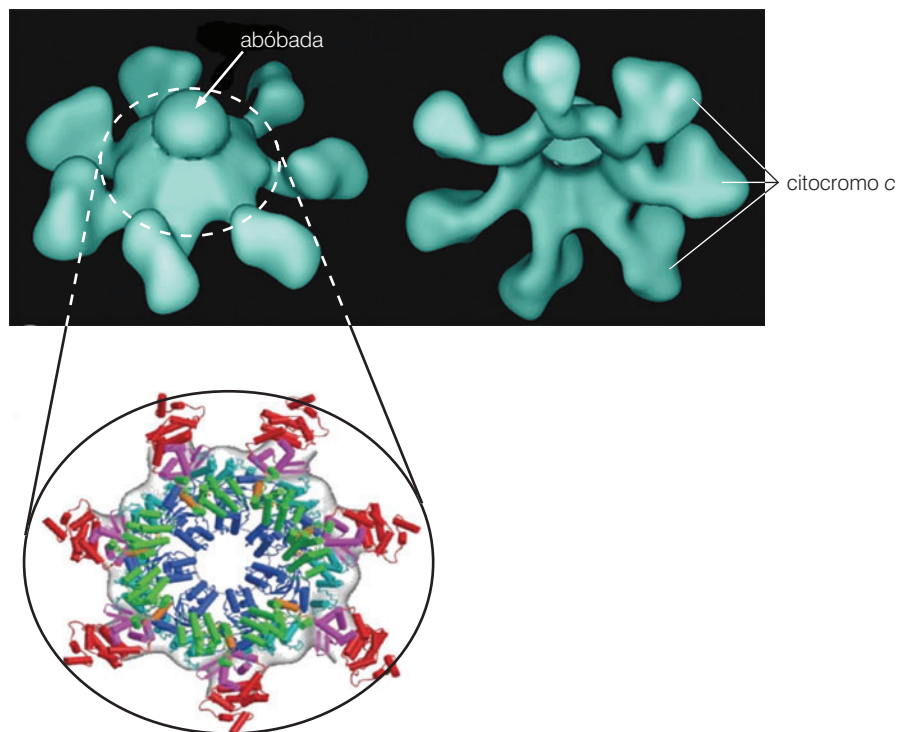


Figura 9.27 Sinais pró-apoptóticos atuam por meio de diversas proteínas relacionadas à *Bcl-2* (A) O raciocínio para a multiplicidade de proteínas como *Bcl-2* é sugerido aqui pelo fato de que vários estresses fisiológicos celulares operam por meio de diferentes proteínas pró-apoptóticas para antagonizar a proteína antiapoptótica *Bcl-2*. Esta proteína é, desse modo, impedida de neutralizar Bax, a proteína pró-apoptótica dominante que atua para liberar o citocromo *c* da membrana mitocondrial. (B) Os múltiplos caminhos de ativação de proteínas BH3 pró-apoptóticas dependem, em parte, da sua amarração, na forma inativa, a várias estruturas citoplasmáticas ou complexadas com domínios inibidores. (C) Cada membro da família de proteínas *Bcl-2* possui seu próprio

conjunto de parceiros opostos. No centro deste esquema, encontram-se as proteínas antiapoptóticas *Bcl-2*, *Bcl-X_L*, *Bcl-w* e *Mcl-1*. Cada uma possui seu próprio conjunto de parceiros antagonistas. Por exemplo, *Bcl-2*, *Bcl-X_L* e *Bcl-w* são antagonizadas pela proteína pró-apoptótica *Bim*. No final deste esquema, encontram-se as proteínas pró-apoptóticas *Bax* e *Bak*; caso não antagonizadas, elas desencadearão a apoptose por meio da abertura do canal da membrana mitocondrial. Nem todos os membros da família de proteínas *Bcl-2* (veja a Figura 9.25A) estão indicados aqui. (A, cortesia de J. Adams; adaptada de S. Cory *et al.*, *Oncogene* 22: 8590-8607, 2003; B, de S. Cory e J.M. Adams, *Nat. Ver. Cancer* 2: 647-656, 2002; C, cortesia de D. Huang.)

Figura 9.28 A roda da morte O apoptossomo – a roda da morte – é montado no citosol quando moléculas de citocromo *c* são liberadas da mitocôndria para o citosol e se associam a Apaf-1. Isso causa a montagem de uma roda de sete raios, na qual Apaf-1 forma os raios e as moléculas de citocromo *c* formam as pontas dos raios (*acima*). Uma vez montada, a estrutura atrai a procaspase 9 para o centro da roda ("abóbada"), que causa a conversão da procaspase 9 na caspase 9 ativa. A estrutura detalhada do círculo interno do apoptossomo, que é formada das sete subunidades de Apaf-1, é ilustrada no modelo molecular (*abaixo*). As hélices azuis no centro são responsáveis pela interação e ativação da procaspase 9. A caspase 9 resultante realiza, por sua vez, a clivagem e ativação de outras caspases, desencadeando, desse modo, a cascata apoptótica. (Topo, a partir de D. Acehan *et al.*, *Mol. Cell* 9: 423-432, 2002; estrutura ampliada, de S.J. Riedh *et al.*, *Nature* 434: 926-933, 2005.)



quais antagonizam Bcl-2, favorecendo, dessa forma, a abertura da membrana mitocondrial externa e o início da apoptose (Figura 9.27A). Além disso, um grande conjunto de outras observações, não ilustradas aqui, indica que as ações de proteínas BH3-only (veja a Figura 9.25A) podem ser controladas por meio da modulação da transcrição de seus respectivos genes, por suas localizações intracelulares, por clivagens proteolíticas, ou por sua fosforilação (p. ex., Figura 9.27B). Os membros pró e antiapoptóticos da família de proteínas Bcl-2 atuam em direção oposta, com cada membro tendo seu próprio parceiro(s) antagonista (Figura 9.27C).

Uma vez tendo escapado da mitocôndria para o citoplasma, moléculas de citocromo *c* associam-se à proteína Apaf-1 e formam uma estrutura que tem sido denominada **apoptossomo** (Figura 9.28). Os complexos de apoptossomo então procedem para ativar uma protease citoplasmática normalmente latente chamada procaspase 9, convertendo-a em caspase 9 ativa. A caspase 9 é um membro de uma família de proteases específicas de cisteíno-aspartato; genes que codificam 11 dessas proteases têm sido mapeados no genoma humano.

Quando convertida na protease ativa pelo apoptossomo, a caspase 9 cliva a procaspase 3 e, dessa forma, ativa ainda outra protease relacionada, a qual cliva e ativa outra procaspase, e assim sucessivamente (Figura 9.29). Essa sequência de clivagens constitui uma cascata de sinalização em que uma protease ativa a próxima da série por meio de clivagem. Tal comportamento é recordativo da organização de cascatas de cinases que verificamos anteriormente (Seção 6.5), em que um grupo de ser/thr cinases ativa uma outra em uma sequência linear. (O fato de que cada uma das caspases atua cataliticamente faz parecer que um sinal iniciador relativamente menor no topo da cascata pode ser amplificado para gerar um grande número de caspases ativadas no final.)

Enquanto o citocromo *c* no citosol serve para ativar as caspases, Smac/DIABLO – uma outra proteína que é liberada da mitocôndria junto com o citocromo *c* – inativa um grupo de proteínas antiapoptóticas chamadas IAPs (inibidores de apoptose, veja a Figura 9.29). Essas IAPs normalmente atuam para bloquear a ação da caspase de duas maneiras: elas ligam-se diretamente e, com isso, inibem a atividade proteolítica da caspase (Figura 9.30) e, em determinados casos, elas podem marcar as caspases para ubiquitilação e degradação. Sem a influência contínua de IAPs, as caspases estão livres para iniciar as clivagens proteolíticas que, finalmente, resultam em apoptose.

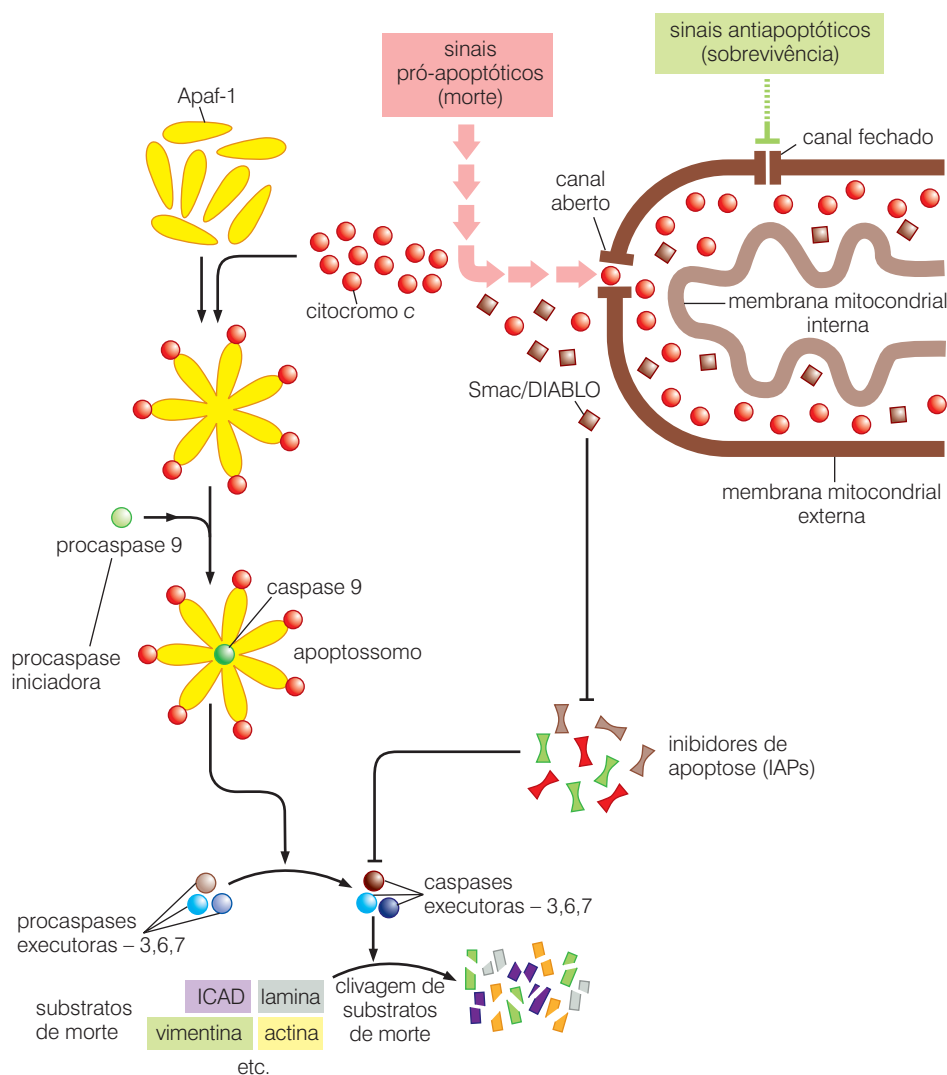


Figura 9.29 A cascata apoptótica de caspase. A membrana mitocondrial externa (marrom-escuro) cria uma porta crítica que determina a vida ou a morte da célula. Diversos sinais antiapoptóticos atuam para manter canais na membrana mitocondrial externa fechados; inversamente, sinais pró-apoptóticos de morte esforçam-se para abrir esses canais (acima, à direita). Dentre as importantes moléculas liberadas no citosol, estão as moléculas de citocromo c (círculos vermelhos) e as moléculas de Smac/DIABLO (quadrados marrons). As moléculas de citocromo c agregam-se com moléculas de Apaf-1 para formar o apoptossomo de sete raios (esquerda; ver Figura 7.29). Este último atrai e ativa a procaspase 9 em caspase 9 (círculo verde), a qual, por sua vez, ativa a procaspase 3 (círculo laranja, esquerda). A caspase 3 ativa resultante ativa uma série de outras procaspases (caspases executoras), as quais, uma vez ativadas, clivam diversos "substratos de morte", cuja clivagem cria o fenótipo celular apoptótico. Normalmente, um número de inibidores de apoptose (IAPs; abaixo, à direita) ligam-se e inativam as caspases. Entretanto, a Smac/DIABLO, que também é liberada da mitocôndria, antagoniza esses IAPs (à direita), protegendo, desse modo, as caspases da inibição por essas moléculas.

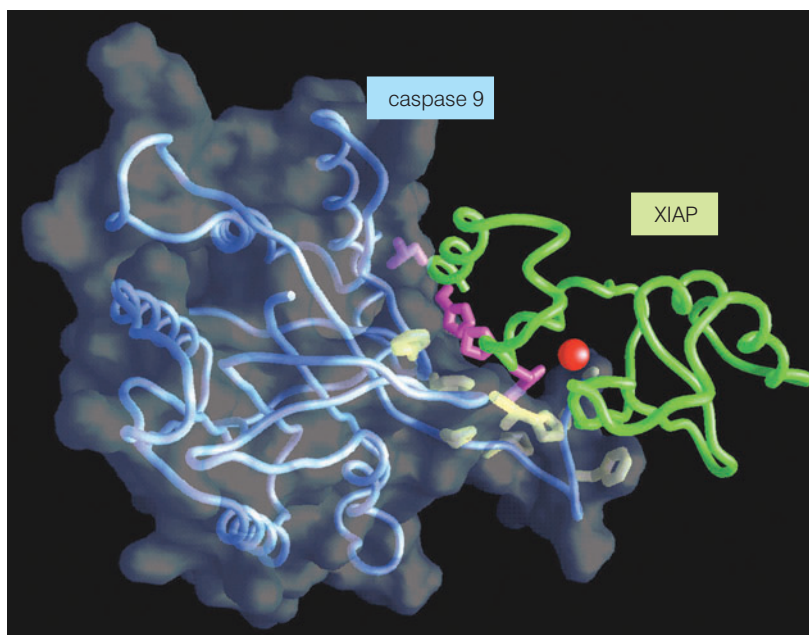


Figura 9.30 Estrutura de um inibidor de apoptose. A grande família de IAPs (inibidores de apoptose) atua por meio da ligação e inibição de diversas moléculas de caspase, prevenindo, dessa maneira, a ativação inadvertida da cascata das caspases e o desencadeamento da apoptose. Verifica-se aqui a estrutura molecular do complexo formado pelo domínio BIR3 de uma molécula IAP chamada XIAP (verde) com a caspase 9 (azul-claro). (Somente o esqueleto peptídico de XIAP é mostrado, enquanto ambos os esqueletos, peptídico e de um modelo espacial preenchido da caspase 9, são mostrados.) Um átomo de zinco no centro desse complexo é mostrado em vermelho, enquanto resíduos críticos nos domínios de interação de XIAP e caspase 9 podem ser visualizados em rosa e amarelo, respectivamente. Essa ligação por XIAP impede a homodimerização da caspase 9, que é requerida para sua atividade. (De E.N. Shiozaki *et al.*, *Mol. Cell* 11: 519-527, 2003.)

Barra lateral 9.6 Amplificação de sinais pró-apoptóticos iniciais assegura a eficiente execução da apoptose Uma vez tomada a decisão de ativar a cascata de caspases pró-apoptóticas, a execução dessa decisão é auxiliada por mecanismos de controle que amplificam e reforçam algumas das etapas iniciais. (Tais mecanismos de retroalimentação positiva são algumas vezes chamados controles de “realimentação”.) Assim, uma das proteínas que é clivada pela caspase 3 é a subunidade Rel do fator de transcrição NF- κ B. Como verificado anteriormente (Seção 6.12), este fator de transcrição é um importante ativador de genes anti-apoptóticos importantes, como *bcl-2*. Por meio da destruição de uma subunidade crítica de NF- κ B, a caspase 3 desloca o balanço regulador adicional em favor da apoptose. De forma provocativa, um derivativo oncogênico de Rel (importante componente do complexo NF- κ B) é a oncoproteína v-Rel produzida pelo retrovírus da reticuloendoteliose aviária. Durante sua evolução no genoma retroviral, o oncogene viral *rel* adquiriu uma deleção e duas mutações pontuais que resultaram na oncoproteína codificada v-Rel resistente à clivagem pela caspase 3, reforçando, dessa maneira, seus poderes antiapoptóticos e seu potencial oncogênico resultante.

Assim, o sinal apoptótico é ativado de duas maneiras seguindo a abertura dos canais mitocondriais. O citocromo *c* é liberado e ativa a caspase 9 no apoptossomo. Ao mesmo tempo, Smac/DIABLO, também liberada pelo canal, marginaliza as IAPs, liberando, desse modo, as caspases da inibição por IAP. (Como um aparte, uma das proteínas funcionalmente importantes que são fosforiladas pela Akt/PKB cinase antiapoptótica é a caspase 9. A fosforilação da caspase 9 inibe essa protease, como pôde ser antecipado por meio das ações antiapoptóticas conhecidas de Akt/PKB.)

A cascata de ativações de caspases, então iniciada, ocorre até que as caspases finais na cascata clivem os “substratos de morte”, ou seja, proteínas cuja degradação cria as mudanças celulares que estão associadas ao programa apoptótico (veja a Figura 9.29). Os papéis especializados dessas várias caspases fizeram com que alguém as classificasse em dois grupos funcionais – as *caspases iniciadoras*, as quais desencadeiam o início da apoptose pela ativação da cascata de caspases; e as *caspases executoras downstream*, as quais realizam o real trabalho de destruir os componentes críticos da célula.

Vários componentes celulares chave são clivados por essas caspases executoras – caspases 3, 6 e 7. Sua degradação causa as profundas transformações morfológicas que acompanham a morte violenta de células apoptóticas. A clivagem de lâminas da superfície interna da membrana nuclear está envolvida, de alguma maneira, na condensação observada da cromatina e no encolhimento nuclear (picnose), que é característico do programa apoptótico. A clivagem do inibidor de DNase ativada por caspase (ICAD) libera esta DNase, a qual, então, fragmenta o DNA cromossomal. A clivagem de proteínas do citoesqueleto, como actina, plectina, vimetina e gelsolina, leva ao colapso do citoesqueleto, à formação das pústulas que se projetam da membrana plasmática e à formação de corpos apoptóticos – os cascos condensados de células que permanecem depois que tudo isso ocorreu (veja a Figura 9.18).

As caspases executoras até estendem o seu alcance de volta para dentro mitocôndria, onde o programa apoptótico é iniciado: um de seus substratos é uma proteína que faz parte da cadeia de transporte de elétrons dentro da mitocôndria. A clivagem dessa pelas caspases leva a interrupção do transporte de elétrons, perda da produção de ATP, liberação de espécies reativas ao oxigênio (ROS) da mitocôndria e perda da integridade estrutural mitocondrial. A eficiente execução de muitas dessas etapas do programa apoptótico é permitida, em parte, por determinadas mudanças que amplificam os sinais iniciadores de apoptose (Barra lateral 9.6). Alguns pesquisadores estimam que 400 a 1.000 proteínas celulares distintas sofrem clivagem durante a apoptose, porém permanece desconhecido como muitas dessas são participantes ativas no programa apoptótico e como muitas são vítimas do dano colateral que ocorre em células que sofrem desintegração.

A cascata de caspases forma a via central de sinalização que determina se a apoptose ocorrerá ou não e, no momento em que é decidido que a apoptose ocorrerá, como as diversas etapas indutoras de morte são ativadas dentro das células. A importância de uma regulação cuidadosa dessas caspases é enfatizada por achados em relação à atividade de E2F1 e apoptose. Anteriormente, verificamos que a atividade excessiva de E2F adverte a célula de uma via de pRb mal-funcionante e induz a apoptose por meio de sua capacidade de ativar a expressão do gene que codifica ARF. Também se torna claro que as E2Fs, assim como E2F1, são capazes de aumentar de 5 a 15 vezes a expressão de diversos genes de caspases chave. Esses aumentos, por si só, não desencadeiam apoptose. Em vez disso, eles sensibilizam a célula a estímulos pró-apoptóticos específicos, tais como aqueles emitidos por p53, inclinando o jogo, desse modo, em favor da apoptose. (As E2Fs podem compor esses efeitos por meio da indução da expressão de diversos genes que codificam parentes pró-apoptóticos de Bcl-2.)

9.14 Duas vias distintas de sinalização podem disparar a apoptose

O programa apoptótico descrito anteriormente pode ser iniciado por p53 em resposta a uma série de sinais, incluindo aqueles que indicam dano genômico substancial, anoxia e desequilíbrios nos sinais reguladores de crescimento que percorrem o circuito intracelular da célula. Para revisar, uma vez p53 tendo sido ativada e colocada em uma configuração indutora de

apoptose, ela pode dirigir a expressão de genes que codificam proteínas como Bax (veja a Tabela 9.2). Bax, então, atua para abrir os canais mitocondriais e, em consequência, o citocromo *c* e outras proteínas pró-apoptóticas escapam da mitocôndria e a apoptose é iniciada por meio da ativação das caspases.

Essa série de eventos é, algumas vezes, chamada de programa *apoptótico intrínseco*, já que os sinais desencadeadores originam-se dentro da célula; outros têm chamado de via apoptótica *ativada por estresse*. De maneiras que ainda permanecem desconhecidas, outros tipos de sinais também podem causar a liberação do citocromo *c* da mitocôndria por meio de mecanismos que parecem não estar envolvidos com p53. Esses incluem estresses como cálcio excessivo dentro da célula, oxidantes excessivos, certos tipos de agentes que danificam o DNA, e ainda outros agentes que rompem os microtúbulos – componentes-chave do citoesqueleto e fuso mitótico. Infecções por diversos vírus tumorais também podem desencadear apoptose. Interessantemente, esses vírus esforçam-se muito para assegurar que o programa apoptótico intrínseco não seja iniciado, a fim de que seus hospedeiros celulares não morram antes que seu ciclo de infecção esteja completo.

De forma importante, a apoptose também pode ser disparada por meio de uma rota alternativa. Esta é iniciada do lado de fora da célula e ativa receptores pró-apoptóticos de superfície celular. Tais receptores são proteínas transmembrana que freqüentemente são chamadas de *receptores de morte*, para indicar a sua capacidade de ativar o programa apoptótico (Figura 9.31). Após a ligação de seus ligantes cognatos no espaço extracelular, os receptores de morte ativam uma cascata citoplasmática de caspases que converge rapidamente na via apoptótica intrínseca descrita anteriormente, disparando, assim, uma resposta apoptótica idêntica àquela verificada depois da ativação do programa apoptótico intrínseco (Figura 9.32). Em virtude dos sinais que ativam os receptores de morte originarem-se do lado de fora da célula, o programa apoptótico iniciado por esses receptores tem sido chamado de programa *apoptótico extrínseco* ou via apoptótica *ativada por receptor*.

Os ligantes dos receptores de morte são membros da família de proteínas do fator de necrose tumoral (TNF), que inclui TNF- α , TRAIL e ligante Fas (FasL) (Tabela 9.4). TNF- α foi o primeiro identificado e estudado, em virtude de sua habilidade em causar a morte de células cancerosas. Subseqüentemente, observou-se que esse grupo de proteínas ligantes era capaz de causar a morte de uma ampla variedade de tipos celulares normais que apresentavam receptores apropriados em suas superfícies. Similares aos fatores de crescimento e seus receptores, cada uma dessas proteínas semelhantes a TNF, incluindo FasL e TRAIL/Apo2L, ligam-se a seus próprios receptores de morte cognatos (Figura 9.31). Membros dessa família de receptores – existem mais de 30 codificados no genoma humano – partilham em comum um “domínio de morte” citoplasmático. O entendimento desses receptores e suas ações são confusos devido aos múltiplos nomes que muitos deles e seus ligantes possuem (veja a Tabela 9.4).

Uma vez ativados pela ligação de seus ligantes, os domínios de morte desses receptores ligam-se e ativam uma proteína associada chamada FADD (proteína de domínio de morte associado a Fas) no citoplasma. O complexo resultante é chamado DISC (complexo de sinalização indutor de morte) e intima as formas inativas de pró-enzimas da caspase 8 e, menos comumente, da caspase 10, as quais estão entre as caspases iniciadoras. DISC então desencadeia a autoclivagem dessas caspases e sua conversão em proteases ativas. As caspases 8 e 10 (caspases iniciadoras dessa via) então ativam as caspases executoras 3, 6 e 7, convergindo, assim, na via de sinalização por meio da qual o programa apoptótico intrínseco atua. Além disso, a caspase 3 pode clivar e ativar a proteína relacionada à Bcl-2 no citosol, chamada Bid, a qual migra para o canal mitocondrial e faz com que este se abra (veja a Figura 9.32). Fazendo isso, Bid realiza a amplificação de sinais pró-apoptóticos do programa apoptótico extrínseco pelo recrutamento de elementos do programa intrínseco para dentro do processo também.

Alguns tipos celulares no corpo são capazes de utilizar ambas as vias apoptóticas para desencadear sua própria morte, enquanto outros confiam unicamente no programa extrínseco ou intrínseco. Por exemplo, uma célula pode disparar sua própria morte por meio do programa extrínseco secretando um ligante para um dos receptores de morte que apresenta em sua superfície; esse ligante pode então atuar de uma maneira autócrina para iniciar a apoptose. O uso do programa intrínseco ou extrínseco pela célula possui implicações para as ações de

proteínas antiapoptóticas como Bcl-2. Assim, em células que podem ativar o programa extrínseco, a superexpressão de Bcl-2 pode não conferir muito benefício, já que os receptores de morte podem tirar vantagem do programa apoptótico intrínseco baseado na mitocôndria por meio da comunicação direta com a cascata de caspases.

De fato, existe uma terceira via de disparo de apoptose, em efeito a outro programa apoptótico extrínseco. Este é desencadeado por linfócitos T citotóxicos e células matadoras naturais

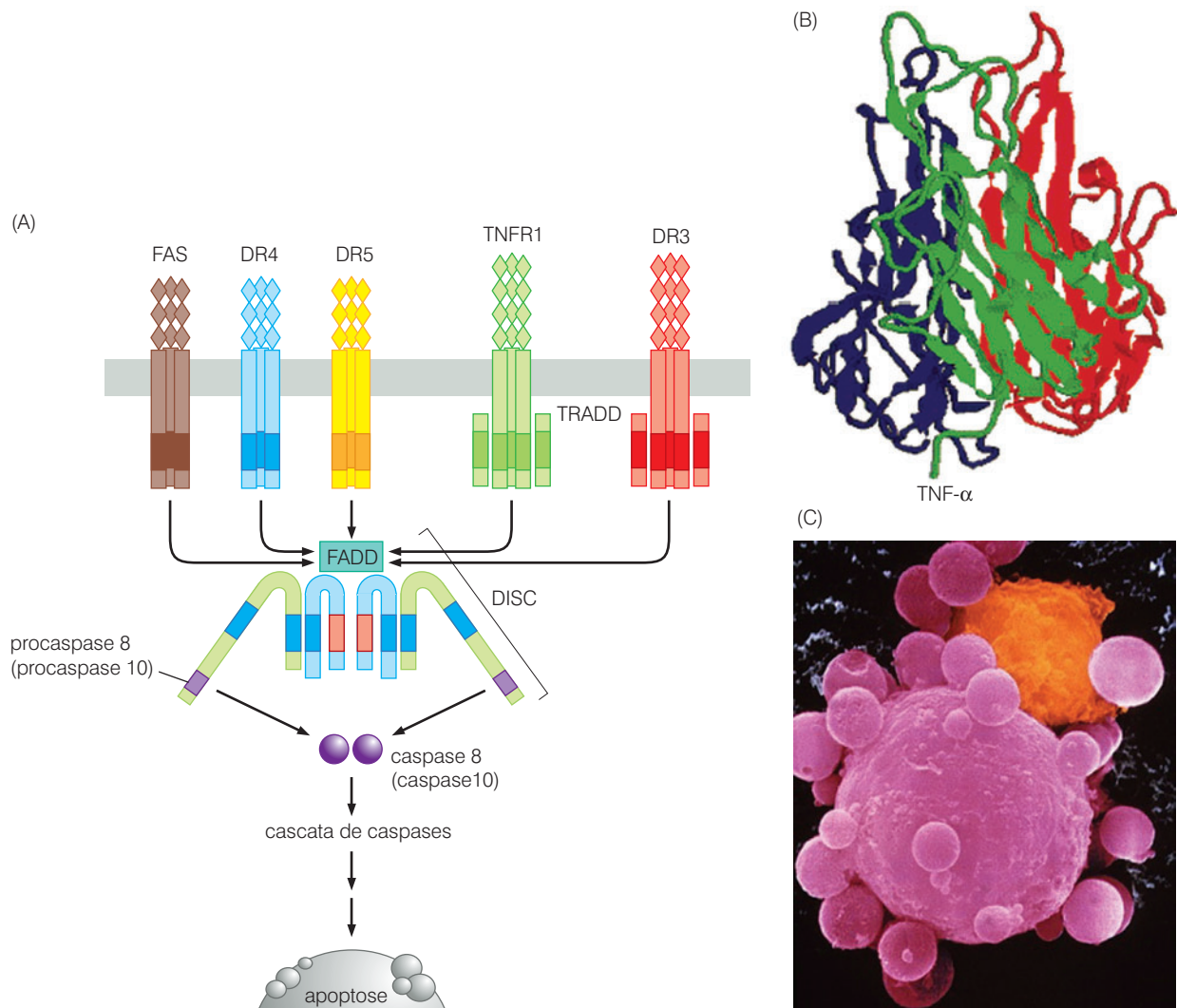


Figura 9.31 Receptores de morte (A) Cinco famílias de proteínas "receptores de morte" estão localizadas na superfície de diversos tipos de células mamíferas. Por exemplo, os ligantes FASL e PO2L/TRAIL ligam-se aos receptores de morte FAS, DR4 e DR5 (*acima, à esquerda*). As caudas citoplasmáticas desses receptores atuam por meio da proteína de domínio de morte associado a FAS (FADD) para montar um complexo de sinalização indutor de morte (DISC), sendo que este realiza a conversão das procaspases 8 e 10 em suas respectivas caspases ativas. Estas, então, convergem na cascata de caspases, que é ativada por meio do programa apoptótico intrínseco. Uma sequência similar de eventos ocorre seguindo a ativação dos receptores TNFR1 e DR3 (*acima, à direita*). Estes receptores de morte diferem de receptores de tirosina cinases (e suas dimerizações induzidas por ligante), nas quais complexos de ligante de três subunidades causam a trimerização do receptor. (B) Os ligantes desses receptores, algumas vezes chamados "ligantes de morte", são

homotrímeros e aparecem para atuar causando a trimerização de seus receptores cognatos. (Estes podem ser comparados com os ligantes de receptores de fator de crescimento [Figura 5.16], muitos dos quais são homodímeros.) Aqui é mostrada a estrutura molecular do fator de necrose tumoral α (TNF- α), o ligante do TNF-R1, com cada monômero apresentado em uma cor distinta. (C) Ligantes de receptores de morte, notavelmente Fasl, são frequentemente utilizados por linfócitos T citotóxicos (CTLs) para matar células cancerosas, as quais apresentam o receptor FAS em suas superfícies. (Em adição, granzimas podem ser injetadas por CTLs em células-alvo; veja a Figura 9.32.) Nesta micrografia eletrônica colorida de varredura, uma CTL (*laranja*) é vista atacando uma célula cancerosa, a qual está em luta de apoptose, como evidenciado pelas numerosas pústulas na sua superfície. (A, adaptada de A. Ashkenazi, *Nat. Rev. Cancer* 2: 420-430, 2002; B, de M.J. Eck e S.R. Sprang, *J. Biol. Chem.* 264: 17595-17605, 1989; C, de Andrejs Liepin/Science Photo Library.)

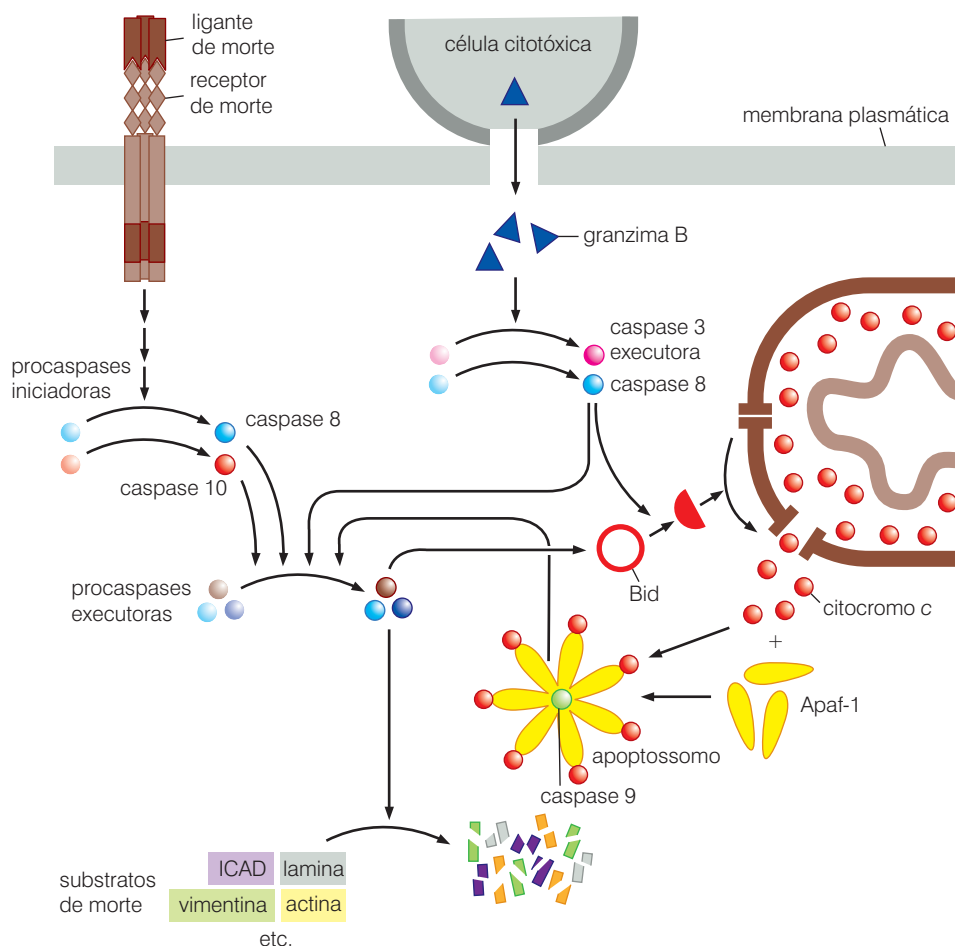


Figura 9.32 Convergência de rotas apoptóticas intrínsecas e extrínsecas Após um receptor de morte celular (Figura 9.34) ativar a procaspase 8 e/ou 10 nas caspases ativas correspondentes (*acima, à esquerda*), estas últimas convergem na cascata apoptótica intrínseca clivando e ativando as caspases executoras (*centro, à esquerda*). Em adição, após a procaspase 3 ter sido ativada em caspase 3, esta cliva e ativa Bid (veja a Figura 9.27B), uma proteína relacionada a Bcl-2 (*centro, círculo vermelho*), a qual se move de sua localização citosólica para a mitocôndria, onde inicia a abertura do canal da membrana mitocondrial externa, ativando, assim, a cascata apoptótica por meio da formação de novos apoptossomos ativados (*centro, à direita; abaixo, à direita*). Uma segunda forma, alternativa, de rota apoptótica extrínseca é iniciada por células citotóxicas que são liberadas pelo sistema imune (*cinza; acima, ao centro*) e ligadas a superfícies de células-alvo, nas quais elas introduzem moléculas de granzima B; uma vez presentes no citosol, estas clivam e ativam as procaspases 3, 8 e 9.

(NK) que se empenham em matar células-alvo. Esses dois tipos de células matadoras – algumas das tropas da linha de frente do sistema imune – podem ativar receptores de morte, como Fas, apresentados na superfície de células que estão sendo escolhidas para destruição. Porém, além disso, as células matadoras podem ligar uma protease, chamada granzima B, na superfície de células marcadas; uma vez internalizada por essas células, a granzima B cliva e ativa as procaspases 3, 8 e 9 (veja a Figura 9.32). Neste ponto, ocorre uma imediata convergência com as outras vias apoptóticas descritas anteriormente.

Esse mapeamento das cascatas apoptóticas intrínseca e extrínseca enriquece nosso entendimento de como p53 realiza a apoptose (Figura 9.33). A proteína p53 promove a expressão dos genes que codificam as proteínas Bax, o receptor Fas e IGFBP-3 (veja a Tabela 9.2). Bax antagoniza a função de Bcl-2 e assim atua na abertura dos canais mitocondriais que liberam o citocromo *c*. O receptor Fas, uma vez expresso na superfície celular, aumenta a resposta das células aos ligantes de morte extracelulares, especificamente FasL. IGFBP-3 é liberada da célula e se liga e sequestra IGF-1 (fator de crescimento semelhante à insulina 1), um fator de crescimento que atua por meio de seu próprio receptor de superfície celular para produzir sinais **tróficos** (de sobrevivência) na célula; em

Tabela 9.4 Receptores de morte e seus ligantes

Nomes alternativos de receptores	Nomes alternativos de ligantes
Fas/APO-1/CD95	FasL/CD95L
TNFR1	TNF- α
DR3/APO-3/SWL-1/TRAMP	APO3L
DR4/TRAIL-R1	APO2L/TRAIL
DR5/TRAIL-R2/KILLER	APO2L/TRAIL

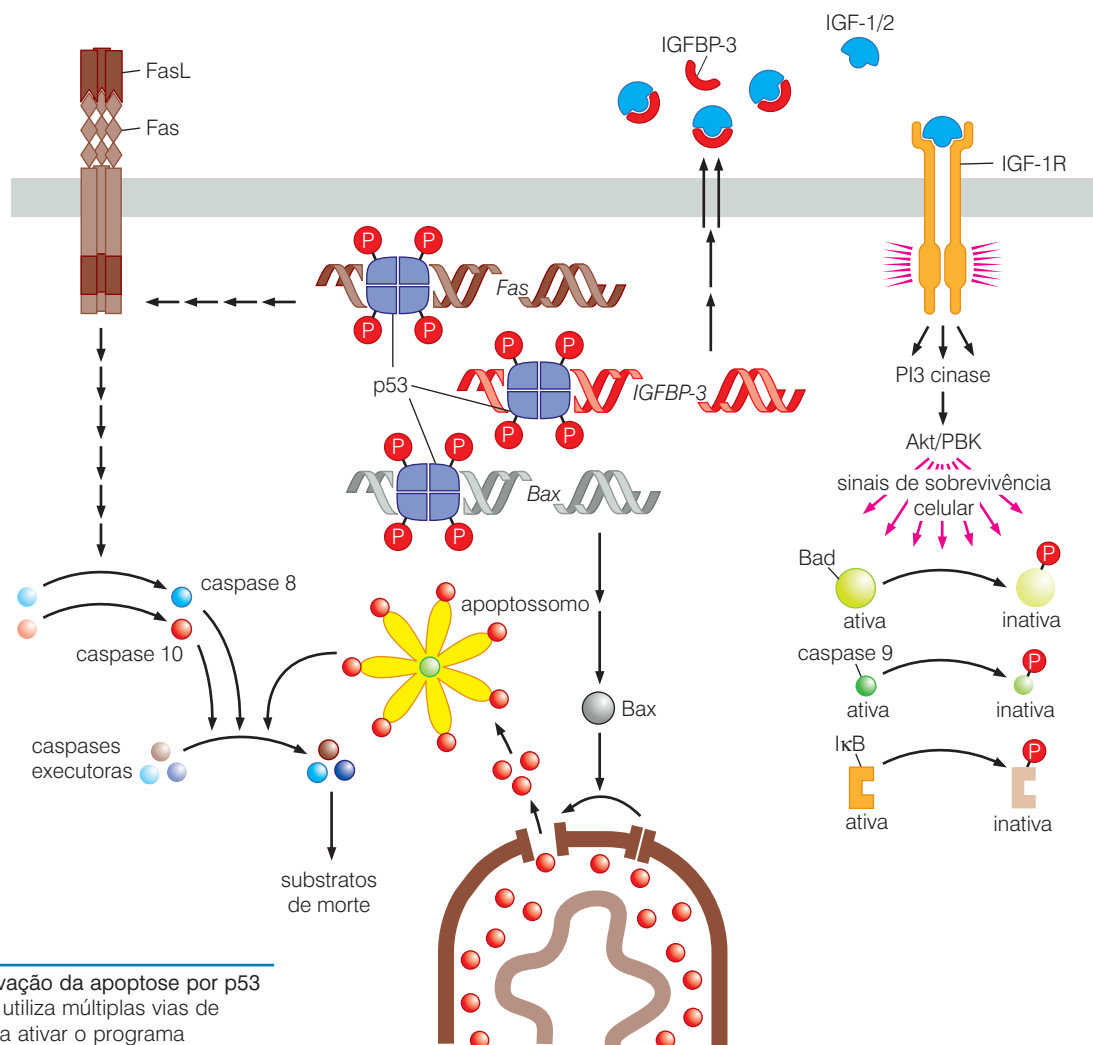


Figura 9.33 Ativação da apoptose por p53
A proteína p53 utiliza múltiplas vias de sinalização para ativar o programa apoptótico. Por meio da indução da expressão do gene que codifica o receptor Fas, ela causa a apresentação deste receptor de morte na superfície celular (*marrom; acima, à esquerda*), sensibilizando a célula a qualquer ligante Fas (FasL) que possa estar presente no espaço extracelular. Pela indução da expressão da proteína-3 ligadora de IGF (IGFBP-3; *vermelho*), p53 causa a liberação dessa proteína no espaço extracelular, onde ela se liga e sequestra IGF-1 e IGF-2 (*azul; acima, no centro*), os ligantes antiapoptóticos, de pró-sobrevivência, do receptor de IGF-1 (IGF-1R; *acima, à direita*). Na ausência de IGFBP-3, IGF-1 se ligaria ao seu receptor e causaria a liberação de sinais antiapoptóticos na célula, incluindo aqueles que levam à inativação das proteínas pró-apoptóticas Bad (relacionada a Bcl-2), caspase 9 e IκB (antagonista de NF-κB). Em adição, p53 dirige a expressão de Bax (*centro*), a proteína pró-apoptótica relacionada a Bcl-2 que causa a liberação de citocromo c e outras proteínas da mitocôndria (*abaixo, no centro*). p53 também inativa diversos outros agentes antiapoptóticos, como Smac/DIABLO (veja a Figura 9.29).

várias células, a redução resultante dos sinais de sobrevivência iniciados por IGF-1 coloca-as no grave perigo de sucumbir a apoptose (Barra lateral 9.7).

Retornaremos ao programa apoptótico extrínseco no Capítulo 15, pois esse pode exercer dois importantes papéis nas complexas interações entre células cancerosas e o sistema imune. Por um lado, as células do sistema imune podem liberar ligantes de morte (como FasL) a fim de disparar a apoptose em células cancerosas que elas tenham marcado para eliminação. Por outro, as células cancerosas podem apresentar ou liberar ligantes de morte que elas desdobram para matar células imunes que se aproximaram muito e ameaçam sua sobrevivência.

A complexidade dos sinais que fluem através das vias apoptóticas enfatiza o fato de que a decisão a favor ou contra a apoptose é alcançada por meio da alteração no *equilíbrio* de complexos arranjos de proteínas pró e antiapoptóticas que influenciam a decisão final de se lançar ou não ao “interruptor apoptótico mestre”.

9.15 Células cancerosas inventam diversas maneiras para inativar parte ou toda a maquinaria apoptótica

Como enfatizado anteriormente, as células que avançam ao longo da estrada para a neoplasia encontram vários indutores de estresse fisiológico que ameaçam sua existência, já que cada

um desses indutores de estresse ameaça o disparo da apoptose. Dentre esses, estão anoxia, desregulação da via de pRb, ativação do oncogene *myc* e diversas formas de dano ao DNA. Esses perigos explicam por que a maioria, e provavelmente todos, dos tipos de células cancerosas tem inativado componentes-chave de sua maquinaria indutora de apoptose (Tabela 9.5; Figura 9.34). Também verificamos essas mudanças a partir da perspectiva do organismo como um todo: o fato de que, virtualmente, todas as células cancerosas humanas empregam estratégias antiapoptóticas sugere que a apoptose é um mecanismo antineoplásico vital que está implantado em células normais a fim de obstruir a progressão de tumor.

Uma estratégia antiapoptótica amplamente explorada por células cancerosas é, como já verificado, a inativação da via de p53. O gene *p53* está alterado em quase metade de todos os genomas celulares de câncer humano, geralmente por mutações pontuais que levam a substituições de aminoácidos no domínio de ligação a DNA de p53. Em uma significativa porcentagem de outros tumores, ARF não é mais expressa. Isso é alcançado, várias vezes, por meio da completa deleção do gene codificante ou por metilação do promotor, esta última resultando na repressão da transcrição. Outros mecanismos que param a expressão de ARF também podem intervir. Uma pequena porcentagem de tumores humanos (a maioria sarcomas) superexpressarão Mdm2. Todos esses mecanismos que afetam a expressão de ARF ou Mdm2 servem para diminuir os níveis da proteína p53 nas células. Finalmente, em algumas células tumorais humanas, p53 parece estar mal localizada, sendo sequestrada no citoplasma, onde não pode realizar sua principal tarefa – ativação transcricional.

Ainda, essa eliminação da função de p53 não parece satisfazer muitos tipos de tumores humanos, os quais adicionalmente lutam para alterar componentes específicos da maquinaria apoptótica. Por exemplo, muitas células de melanomas exibem metilação e, dessa forma, inativação funcional do promotor do gene *APAF1*, o qual codifica a proteína citosólica que se liga com o citocromo *c* liberado para formar o apoptossomo e ativar a caspase 9. O gene pró-apoptótico *Bax* (veja a Tabela 9.5) é inativado por mutação em mais da metade dos cânceres de cólon que mostram instabilidade de microsatélite (Capítulo 12). A expressão desregulada de *BCL2* (a versão humana de *bcl-2*) é encontrada em linfomas de célula B foliculares, e a expressão de *BCL-2* encontra-se elevada em um grande número de tumores humanos de diversas origens teciduais; por algumas estimativas, no mínimo a metade de todos os tumores humanos apresenta aumento da expressão de *BCL-2*.

Uma outra estratégia efetiva para adquirir resistência à apoptose deriva da hiperativação da via PI3K→Akt/PKB (Seção 6.6). A ativação dessa via pode ser alcançada por meio de ações colaboradoras de receptores de tirosina cinase que emitem sinais e a oncoproteína Ras, am-

Barra lateral 9.7 Fatores extracelulares também favorecem a sobrevivência celular Temos lido a respeito de uma variedade de alterações do circuito de sinalização intracelular que são utilizadas por células cancerosas para diminuir a probabilidade de seus programas apoptóticos serem desencadeados. Entretanto, a estratégia de sobrevivência mais amplamente utilizada parece envolver uma via de sinalização extracelular que possui um papel na fisiologia tecidual normal: muitas células normais parecem depender da exposição contínua a sinais tróficos (i. e., de sobrevivência), tais como aqueles transferidos pelos fatores de crescimento semelhantes à insulina 1 e 2 (IGF-1, IGF-2), com o propósito de permanecerem viáveis. Níveis inadequados desses fatores no ambiente celular podem desencadear apoptose, um processo que tem sido chamado de “morte por negligência”.

Muitas células cancerosas secretam anormalmente altos níveis de IGF-1 ou IGF-2. Uma vez liberados pelas células cancerosas, ambos os fatores de crescimento ligam-se e ativam o receptor de IGF-1 (IGF-1R), que é apresentado pela grande maioria dos tipos celulares pelo corpo. Essa ativação de receptor autócrino, por sua vez, causa a libera-

ção de sinais intracelulares que são fortemente antiapoptóticos por meio de sua capacidade de ativar a rota de PI3K-Akt/PKB (Figura 9.34). Tem sido relatado que alguns tumores humanos superexpressam mRNA de IGF-2 centenas de vezes, apesar desse grau de superexpressão ser bastante incomum.

Outra estratégia comum envolve a redução nos níveis efetivos de uma proteína ligadora de IGF (IGFBP), que normalmente reduz os níveis efetivos de IGFs ativos no espaço extracelular por ligação e sequestro destas (veja a Figura 9.3). (No mínimo seis IGFBPs distintas têm sido descritas.) Em alguns tumores, a metilação do promotor de um gene *IGFBP* reduz a expressão de sua proteína codificada e, assim, os níveis dessa proteína na imediata vizinhança de uma célula cancerosa. Em outros tumores, as células cancerosas podem aumentar a síntese e secreção de certas metaloproteínas de matriz (MMPs), as quais clivam e, assim, inativam moléculas de IGFBP no espaço extracelular circundante. Por meio da redução dos níveis de IGFBPs funcionais, ambos os mecanismos causam o aumento nas concentrações efetivas de IGFs, as quais, por sua vez, favorecem a sobrevivência de células cancerosas.

Tabela 9.5 Exemplos de alterações antiapoptóticas encontradas em células tumorais humanas

Alteração	Mecanismo de ação antiapoptótico	Tipos de tumores
metilação do promotor <i>CASP8</i> repressão de <i>CASP3</i> superexpressão de survivina ^a	inativação da cascata extrínseca inativação da caspase executora inibidor de caspase	SCLC, tumores pediátricos carcinomas de mama mesoteliomas, melanomas, muitos carcinomas
ativação de ERK ativação de ERK ativação de Raf mutação/ativação de <i>PI3K</i> ativação constitutiva de NF- κ B ^b mutação de <i>p53</i> inativação do gene <i>p14^{ARF}</i> superexpressão de Mdm2 amplificação do gene <i>IAP-1</i> metilação de <i>APAF1</i> mutação de <i>BAX</i> superexpressão de <i>Bcl-2</i> inativação de <i>PTEN</i>	repressão da expressão de caspase 8 proteção de Bcl-2 da degradação seqüestro de Bad por proteínas 14-3-3 ativação de Akt/PKB indução de genes antiapoptóticos perda da capacidade de induzir genes pró-apoptóticos supressão dos níveis de p53 supressão dos níveis de p53 antagonista das caspases 3 e 7 perda de ativação da caspase 9 pelo citocromo c perda de proteína pró-apoptótica fecha o canal mitocondrial hiperatividade da Akt/PKB cinase	muitos tipos muitos tipos muitos tipos gastrintestinal muitos tipos muitos tipos muitos tipos sarcomas esofágico, cervical melanomas carcinomas de cólon ~1/2 de tumores humanos glioblastoma, carcinoma de próstata, carcinoma endometrial
superexpressão de IGF-1/2 repressão de <i>IGFBP</i> <i>caseína cinase II</i> metilação de <i>TNFR1</i> superexpressão de FLIP ativação de Akt/PBK	ativa PI3K perda do antagonista IGF-1/2 antiapoptótico ativação de NF- κ B expressão reprimida de receptor de morte inibição da ativação da caspase 8 por receptores de morte fosforilação e inativação de proteínas pró-apoptóticas similares a Bcl-2	muitos tipos muitos tipos muitos tipos tumor de Wilms melanomas, muitos outros muitos tipos
ativação de Stat3 repressão de <i>TRAIL-R1</i> superexpressão de FAP-1 metilação de <i>XAF1</i> ^c superexpressão de Wip1 ^d	induz a expressão de Bcl-X _L perda de resposta ao ligante de morte inibição da sinalização do receptor Fas perda da inibição de XIAP antiapoptótica supressão da ativação de p53	diversos tipos carcinoma de pulmão de célula pequena carcinoma pancreático carcinoma gástrico carcinomas de mama e de ovário, neuroblastoma

^a Survivina é um inibidor de apoptose (IAP) em câncer gástrico, de pulmão, bexiga e melanomas, em adição aos mesoteliomas indicados aqui. A expressão de um número de genes IAP é diretamente induzida pelo TFs NF- κ B.

^b Induz a síntese de c-IAPs, XIAP, Bcl-X_L e outras proteínas antiapoptóticas.

^c XAF1 (fator 1 associado a XIAP) normalmente liga-se e bloqueia as ações antiapoptóticas de XIAP, a mais potente das IAPs.

^d Wip1 é uma fosfatase que inativa p38 MAPK, a qual, então, fosforila e estimula as ações pró-apoptóticas de p53.

bos os quais ativam PI3K; o resultado é o aumento no nível de PI3K e ativação de Akt/PKB. A inativação do gene que codifica PTEN, a fosfatase que quebra PIP₃, tem um efeito similar. Uma vez Akt/PKB tendo sido ativada pela PIP₃ que está acumulada, ela pode fosforilar e, assim, inibir proteínas pró-apoptóticas como Bad, caspase 9 e I κ B, e, ao mesmo tempo, fosforilar e ativar Mdm2, o antagonista-chave de p53 (Tabela 6.3).

Têm sido encontrados diversos tipos celulares de câncer, variando de leucemias a carcinomas de cólon, que recorrem a um outro mecanismo para se proteger contra a apoptose: eles ativam a expressão do fator de transcrição NF- κ B. Como verificamos anteriormente, NF- κ B geralmente é seqüestrado na forma inativa no citoplasma e, em resposta a determinados sinais fisiológicos, é liberado e translocado ao núcleo, onde ativa um grande grupo de genes-alvo (Seção 6.12). Vários destes genes estão envolvidos em funções pró-inflamatórias e angiogênicas. Em adição, um significativo conjunto de genes-alvo de NF- κ B funciona como antagonista de apoptose; dentre estes estão incluídos *IAP-1*, *IAP-2*, *XIAP*, *IEX-1L*, *TRAF-1* e *TRAF-2*, os quais servem para bloquear ambos os programas apoptóticos, intrínseco e extrínseco. Essa lista de alvos de NF- κ B está expandindo rapidamente, e é provável que a superexpressão de alguns desses genes antiapoptóticos (e proteínas codificadas) encontrados em muitos tipos de células cancerosas humanas será sinalizada diretamente às ações de NF- κ B hiperativado dentro dessas células.

Uma outra estratégia para escapar da apoptose é evidente em neuroblastomas infantis, nos quais a amplificação do gene *N-myc* normalmente indica crescimento de tumor agressivo e pouca expectativa de vida. Propriamente, essa amplificação, na verdade, ameaça a prolifera-

especulação de que as células do sistema imune cercam células cancerosas e tentam matá-las por meio da liberação de fatores semelhantes a TNF e da resultante iniciação do programa apoptótico extrínseco. Dado o complexo diagrama de fiação do circuito controlador da apoptose, é virtualmente certo que muitas estratégias antiapoptóticas adicionais serão descobertas em diversos tipos de células cancerosas humanas.

9.16 Sinopse e perspectivas

Nos capítulos anteriores deste livro, nos concentramos nos mecanismos moleculares que impulsionam a proliferação celular adiante ou que a tem segurado. Os reguladores – os produtos de (proto) oncogenes e genes supressores de tumor – atuam para processar sinais mitogênicos e antimitogênicos extracelulares que colidem com a maquinaria do ciclo celular. Esses sinais convergem nas decisões finais que determinam se as células avançarão através do ciclo ativo de crescimento e divisão, retrocedendo reversivelmente em latência ou entrando irreversivelmente no estado diferenciado, pós-mitótico.

Neste capítulo, enfocamos processos fisiológicos celulares completamente diferentes, a maioria dos quais são responsáveis pelo monitoramento do bem-estar interno de células. O aparato de monitoramento conduz a contínua sobrevivência de sistemas celulares vitais, incluindo acesso ao oxigênio, estado físico do genoma e equilíbrio de sinais que fluem através de circuitos reguladores de crescimento. Se monitores celulares determinam que um sistema vital está danificado ou em mau funcionamento em uma célula, um sistema de alarme é disparado e o crescimento é parado ou, mais drasticamente, a célula é induzida a ativar seu programa apoptótico previamente latente.

A proteína p53 reside no coração dessa maquinaria de sinalização. Notavelmente, uma ampla variedade de sinais de alarme converge nessa única proteína. Dependendo da gravidade do estresse celular e da capacidade das células em reparar defeitos que têm sido detectados, p53 irá temporariamente segurar o avanço do ciclo celular ou ativar o programa apoptótico.

O gene *p53* e a proteína codificada têm sido o assunto de mais de 30 mil trabalhos de pesquisa que têm surgido na literatura científica no último quarto de século após a descoberta da proteína p53, em 1979. Essa extraordinária concentração de pesquisa em um único gene e proteína reflete tanto o papel central que esta proteína exerce na patogênese do câncer como a freqüente presença de alelos *p53* mutantes nos genomas de células cancerosas humanas. Apesar da enorme quantia de literatura científica sobre p53, a pesquisa dessa proteína está continuamente trazendo surpresas (veja a Barra lateral 9.8).

Não obstante sua vastidão, esse corpo de pesquisa em p53 tem falhado em fornecer uma clara resposta ao mais impressionante enigma criado pela existência da proteína: por que as células de mamíferos confiam tantas funções vitais de alarme a uma única proteína? Uma vez que uma célula tenha perdido a função de p53, torna-se esquecida, em um único golpe, a uma variedade de condições que normalmente levariam a uma parada em sua proliferação ou ao desencadeamento do programa apoptótico.

Diferentemente dos outros genes supressores de tumor que temos encontrado, esse gene em geral não está deletado em genomas de células cancerosas. Em vez disso, alelos mutantes que codificam substituições de aminoácidos são geralmente observados – um testemunho dos poderes dominante-negativos das proteínas p53 mutantes. Como discutido aqui, tais alelos sutilmente defectivos são mais efetivos em bloquear a sobrevivência da função tipo selvagem de *p53* do que alelos nulos que surgiriam da deleção de parte de toda a sequência que codifica esse gene.

Como veremos no Capítulo 11, o desenvolvimento de tumor é um complexo processo de múltiplas etapas que envolve mudanças em múltiplos circuitos de controle celular. Em virtude de p53 receber sinais a partir de muitos sensores distintos de dano ou estresse fisiológico, a perda da função dessa proteína exerce um papel em muitas dessas etapas. Por exemplo, no início do desenvolvimento de carcinomas de bexiga, mama, pulmão e cólon, quando o cres-

Barra lateral 9.8 p53 atua diretamente na mitocôndria A proteína p53 tem sido amplamente vista como uma proteína que exerce todos os seus efeitos pró-apoptóticos por meio de sua capacidade de ativar a transcrição de genes-chave pró-apoptóticos no núcleo. Entretanto, diversos relatos científicos indicam que p53 pode contribuir para a apoptose mesmo quando permanece confinada no citoplasma. Esses trabalhos demonstram que p53 é capaz de liberar a proteína pró-apoptótica Bak das “garras” da proteína antiapoptótica Bcl-X_L. Além disso, p53 pode se associar diretamente a Bax, uma outra proteína-chave pró-apoptótica, e ativá-la funcionalmente, possibilitando que esta abra os canais da membrana mitocondrial, levando, assim, à liberação do citocromo *c* no citosol e ao desencadeamento da apoptose. Conseqüentemente, p53 parece estar mais diretamente envolvida na ativação da maquinaria pró-apoptótica do que previamente suspeitado. Por razões que permanecem ainda pouco entendidas, formas mutantes de p53 de tumores humanos que não apresentam atividade de ativação da transcrição também perdem a capacidade de ativar Bax.

cimento pré-maligno está presente, a sinalização de dano ao DNA já está ativa, como indicado pela presença das cinases ATM e Chk2 fosforiladas e funcionalmente ativas. Em adição, o substrato de p53 da ATM cinase e da Chk2 cinase também está fosforilado e aparentemente ativo, já que o gene *p53* ainda está em sua configuração tipo selvagem nesse estágio de progressão de tumor. Isso indica que as lesões no DNA são difundidas nas células desses crescimentos, mesmo no estágio inicial da tumorigênese, e sugere que p53 está se esforçando para bloquear a proliferação das células nesses crescimentos e que pode induzir a apoptose destas com alguma frequência. Consequentemente, essas células pré-malignas conseguem benefício por meio da eliminação da função de p53, liberando-as dos efeitos citotásticos e pró-apoptóticos desta proteína.

Nesse estágio de desenvolvimento tumoral, as células que realizam a perda da função de p53 também podem ganhar vantagens especiais por terem uma melhor chance de escapar da apoptose, que é desencadeada por essa proteína em resposta à hipoxia grave. (Em geral, crescimentos pré-malignos iniciais ainda não desenvolveram um acesso adequado à circulação e ao oxigênio fornecido por ela.) Além disso, como p53 induz a expressão da potente molécula antiangiogênica trombospodina (Tsp-1), a perda de p53 pode acelerar o desenvolvimento de redes de capilares vizinhos que podem curar a hipoxia que células cancerosas incipientes têm sofrido.

Mesmo tarde na progressão de tumor, quando carcinomas malignos se desenvolvem, a ausência de função de p53 comprometerá alguns dos sistemas de reparo de DNA da célula e, ao mesmo tempo, permitirá que células que carregam danos nos genomas tenham uma vantagem de sobrevivência maior; o resultado é um aumento na taxa de alteração genômica e aceleração associado à taxa de desenvolvimento de tumor. Durante esses últimos estágios de desenvolvimento tumoral, a ausência da função de p53 pode conferir benefício adicional, permitindo que as células sobrevivam aos efeitos colaterais pró-apoptóticos de oncogenes como *myc*. Essa pequena lista revela o quão verdadeiramente catastrófica pode ser a perda da função de p53 para um tecido e, finalmente, para o organismo como um todo.

Os desastrosos efeitos da inativação de p53 podem ser compostos mais tarde caso as células tumorais p53 mutantes tornem-se clinicamente aparentes e sejam alvos para quimioterapia e radiação. Esses tratamentos são frequentemente direcionados para danificar os genomas dessas células, provocando, assim, sua morte por apoptose. De fato, os efeitos pró-apoptóticos da maioria das terapias anticâncer existentes são a razão central pela qual essas terapias têm sucesso, em muitas circunstâncias, de parar o crescimento adicional de tumores. Infelizmente, parece que a perda da função de p53, a qual é verificada frequentemente em tumores humanos, confere uma menor resposta dessas neoplasias a muitas dessas estratégias terapêuticas.

Nossa compreensão sobre a proteína p53 ainda é bastante superficial, em despeito da vasta literatura que a descreve. Uma indicação de quanto mais é necessário para se aprender vem de esforços em catalogar sistematicamente a lista de genes regulados por p53 no genoma humano; mais de 120 foram identificados, somente uma pequena proporção dos quais são citados na Tabela 9.2. Ainda outra indicação deriva de análises das modificações pós-traducionais de p53. Como temos verificado, essas modificações afetam a estabilidade de p53 e, assim, sua concentração intracelular. Em adição, elas provavelmente também afetam as interações de p53 com outras proteínas nucleares, notavelmente fatores de transcrição, que influenciam os genes que sofrem a ação de p53. A extensão da complexidade dessa regulação é sugerida pela Figura 9.35, na qual estão indicados os sítios de modificações pós-traducionais de p53 e a natureza dessas modificações. No mínimo seis tipos distintos de modificação, envolvendo grupos fosfato, acetil, ubiquitil, sumoil, nedil e metil, decoram as moléculas de p53 presentes em células humanas. (Os grupos nedil e sumoil são similares aos grupos ubiquitil, porém apresentam efeitos muito diferentes nas proteínas que se ligam.)

Três dimensões adicionais de complexidade estão indicadas na Figura 9.35. Primeiro, determinados resíduos de aminoácidos, como a serina 15 (S15), podem ser fosforilados por múltiplas proteínas cinases; sabe-se que no mínimo cinco cinases alternativas fosforilam esse

resíduo em particular. Segundo, outros resíduos, como a lisina 372 (L372), podem ser modificados por múltiplas maneiras alternativas; este resíduo em particular pode sofrer metilação, acetilação, ubiquitilação ou nedilação. Terceiro, o número de enzimas que modificam p53 – no mínimo 28 estão indicadas aqui – provavelmente refletem o número de distintas vias de sinalização que vão de encontro a p53 e perturbam sua função.

A inativação de p53 é somente uma das muitas estratégias que células cancerosas empregam para se protegerem contra o perigo da apoptose. Essas manobras comprometem a resposta apoptótica em muitos outros níveis, incluindo a perturbação da expressão de receptores de morte, sua habilidade em ativar caspases e as próprias atividades das caspases. Ainda outras manobras defensivas realizadas por células cancerosas auxiliam na prevenção da abertura dos poros da membrana externa da mitocôndria (veja a Figura 9.34). Essas diversas estratégias ilustram o fato de que a maquinaria apoptótica, como todas as máquinas bem-reguladas, atua por meio das ações equilibradas de elementos mutuamente antagonistas. As células cancerosas exploram a preexistência de componentes antiapoptóticos dessa maquinaria por meio do aumento de seus níveis ou atividades, levando, desse modo, o equilíbrio para longe da apoptose. Essas mudanças em componentes específicos da maquinaria apoptótica podem compor os efeitos de perda de p53, aumentando a resistência de células cancerosas a uma variedade de sinais que geralmente provocariam morte celular. Ao mesmo tempo, os níveis de fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1), nos tecidos que circundam clones de células cancerosas incipientes, também podem causar profundos efeitos no desenvolvimento de tumor por meio da redução da probabilidade de apoptose.

A capacidade de determinados fatores de transcrição promotores de crescimento, notavelmente Myc e as E2Fs, de provocar apoptose cria um paradoxo. A expressão ectópica de ambas, E2F1 e Myc, pode, propriamente, forçar as células famintas por mitógenos a deixar a latência G_0 , entrar no ciclo ativo de crescimento e divisão, atravessar a fase G_1 e entrar na fase S. Por que esses fatores de transcrição não dirigem ativamente o crescimento das células para a apoptose antes de elas completarem um único ciclo celular?

Uma importante resposta vem do fato de que as células passam através de G_1 e ativam suas funções pró-apoptóticas, concomitantemente ativando sinais antiapoptóticos; o equilíbrio entre esses dois determina o destino final da célula.

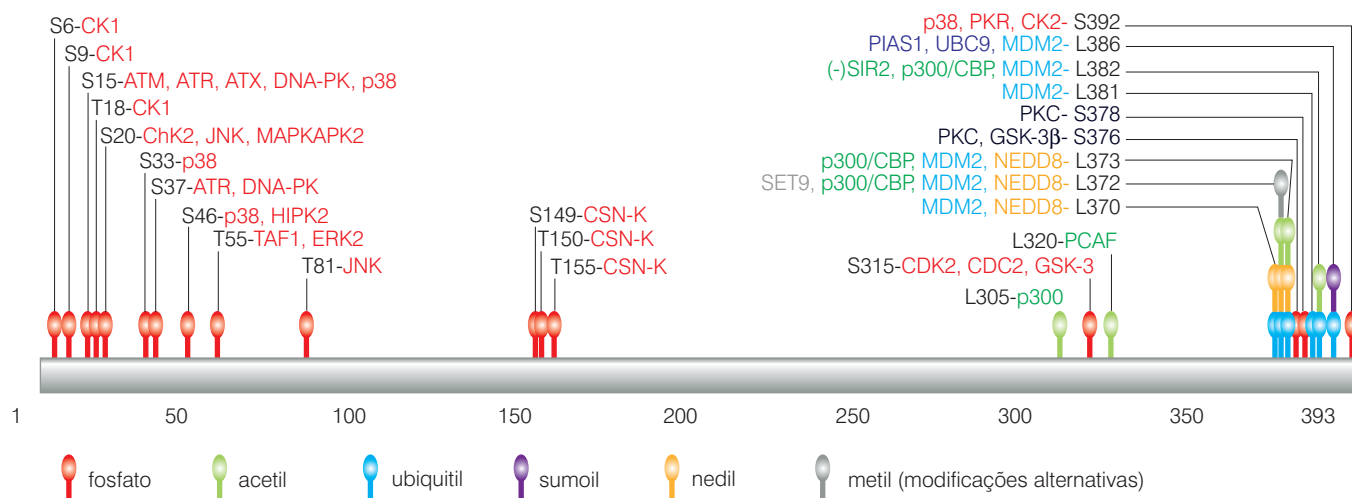


Figura 9.35 Múltiplos tipos de modificações pós-traducionais de p53 A fosforilação de p53 por diversas cinases (veja a Figura 9.12) representa somente um tipo de modificação que parece ser importante ao seu funcionamento. Em adição à ligação de grupos fosfato (vermelho), outras enzimas a modificam por meio da ligação de acetil (verde), ubiquitil (azul),

sumoil (lilás), nedil (laranja) e metil (cinza) nos resíduos de aminoácidos indicados e nos números dos resíduos (em preto). As identidades das enzimas modificadoras estão indicadas (várias cores de fonte) à direita ou à esquerda dos números do resíduo de aminoácido. SIR2 atua para desacetilar p53. (Cortesia de K.P. Olive e T. Jacks.)

Por exemplo, muitos dos fatores de crescimento mitogênicos que estimulam a função de Myc e E2F1 em G₁ também ativam um número de proteínas antiapoptóticas, e são estas últimas que geralmente predominam e permitem à célula sobreviver e proliferar.

Tal pensamento ganha ainda outra questão: por que células estimuladas por mitógenos entram no aborrecido ciclo de crescimento ativo para sintetizar uma variedade de proteínas pró-apoptóticas, das quais a presença excessiva coloca essas células na beira do abismo da apoptose? De acordo com um modelo atrativo, porém ainda especulativo, sempre que as células entram no ciclo de divisão e crescimento, elas correm o risco de desastres inesperados, notavelmente aqueles que ocorrem durante suas fases S e M. Alguns desses acidentes podem levar a mudanças perigosas no genoma, e essas, por sua vez, podem desencadear o desenvolvimento de clones de células malignas. Assim, todas as células, entrando no ciclo celular ativo, colocam sua maquinaria pró-apoptótica em um estado de grande alerta, sensibilizando-a a sinais que podem rapidamente ativar o programa apoptótico no momento em que essas células esbarram em um ponto ou em um outro que elas tentam executar o complexo programa de crescimento e divisão.

Como aspectos adicionais de morte celular têm sido descobertos, torna-se bastante aparente que a apoptose, como a descrevemos neste capítulo, não é a única forma de morte celular programada. Um segundo programa de morte, conhecido como **autofagia**, parece exercer um papel-chave na eliminação de células indesejadas em diversos tecidos do corpo. Este programa é freqüentemente ativado quando células sofrem privação de nutrientes e, em resposta, digerem suas próprias organelas intracelulares em lisossomos citoplasmáticos a fim de reciclar e recolher diversas espécies químicas que podem auxiliar na sua sobrevivência (Figura 9.36).

A autofagia também pode ser utilizada como uma maneira de eliminar células cancerosas. Assim, o gene que codifica Beclin-1, uma proteína-chave promotora de autofagia, é freqüentemente encontrado em números de cópias reduzidos em diversos tipos de cânceres humanos, sendo que a deleção de uma de suas cópias na linhagem germinativa de camundongos leva a um grande aumento na incidência de tumor. Juntas, essas linhas de evidências indicam a abertura de uma área inteiramente nova de pesquisa em morte celular que apresenta claras implicações para o nosso entendimento da patogênese do câncer.

Por último, no Capítulo 16, veremos algumas tentativas recentes no desenvolvimento de novas formas de terapia que são projetadas para mobilizar componentes da maquinaria apoptótica que permanece intacta em células cancerosas. Essas terapias são inícios imaturos, e somente começamos a reconhecer as dificuldades e as oportunidades que a via apoptótica fornece àqueles que gostariam de curar a disparada coleção de doenças que chamamos de câncer.



Figura 9.36 Autofagia Esta micrografia eletrônica revela as vesículas de multicamadas (*seta*) que se formam no citoplasma de células que sofrem autofagia. Diversas organelas citoplasmáticas incorporam-se em lisossomos, nos quais seus componentes são quebrados para posteriormente serem utilizados para o suprimento de nutrientes da célula. (Cortesias de J. Debnath e J.S. Brugge.)

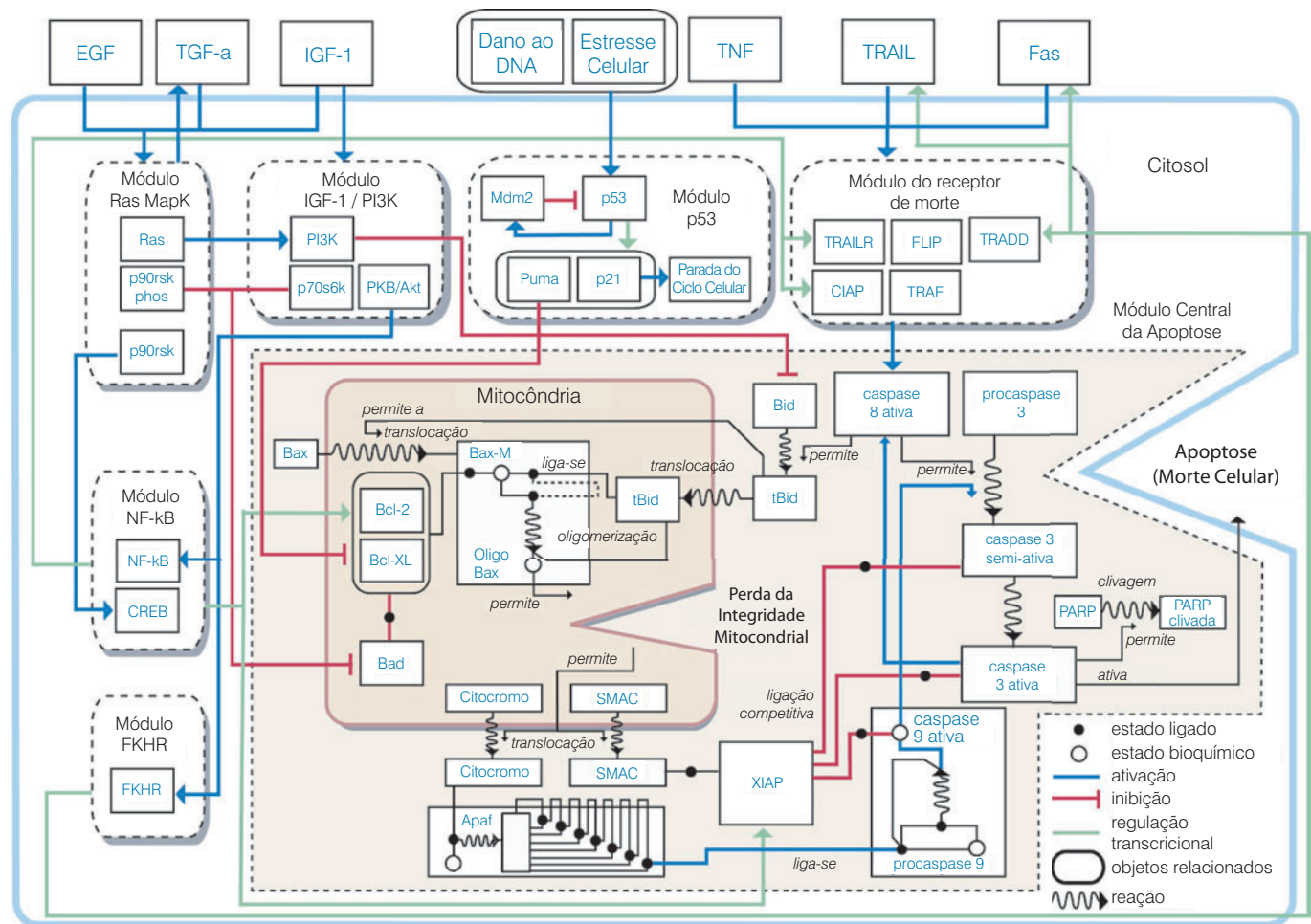


Figura 9.37 O esquema do circuito apoptótico. O arranjo completo de componentes que governam a apoptose ainda é desconhecido. Um dos objetivos da pesquisa em apoptose é entender de uma forma quantitativa como esses componentes interagem dentro de uma célula para influenciar a decisão de iniciar ou não a apoptose. Tal trabalho

deveria finalmente resultar em modelos matemáticos que predizem, com alguma exatidão, como o circuito apoptótico responderá a diversos sinais extra e intracelulares. Uma tentativa inicial em modelagem desse sistema de sinalização é mostrada aqui. (Cortesia de I. Khalil e Gene Network Sciences, Inc.)

A esperança é que em algum tempo, no futuro não muito distante, o circuito que governa a apoptose será compreendido de uma maneira quantitativa (talvez por meio de um diagrama esquemático, como na Figura 9.37), e que seremos capazes de prever o seu comportamento com precisão e manipulá-lo dentro de células cancerosas.

Conceitos-chave

- Organismos tentam bloquear o desenvolvimento de câncer por meio de ações de alarme da proteína p53, a qual pode fazer com que as células entrem em latência ou apoptose no momento em que a maquinaria reguladora da proliferação celular estiver em mau funcionamento ou a célula estiver exposta a diversos tipos de estresse fisiológico.
- p53 em geral retorna rapidamente. Essa reciclagem é bloqueada quando uma variedade de sinais indica estresse celular fisiológico ou dano ao DNA.
- A p53 mutante encontrada em tumores humanos geralmente apresenta substituições de aminoácidos. Isso permite que a p53 mutante interfira na p53 tipo selvagem, com a qual pode formar complexos tetraméricos.

- p53, a qual atua como um fator de transcrição, pode impor a apreensão do ciclo celular por meio da sua capacidade de induzir a expressão de p21^{Cip1} e a apoptose por meio de sua capacidade de induzir a expressão de várias proteínas pró-apoptóticas.
- Uma variedade de estresses celulares fisiológicos pode levar à ativação de p53; dentre esses estão anoxia, dano ao genoma e desequilíbrios de sinalização na maquinaria reguladora do crescimento intracelular.
- p53 torna-se funcionalmente ativada quando sua degradação normalmente rápida é bloqueada. Em adição, modificações covalentes da proteína p53 acumulada potencializam sua atividade como um fator de transcrição.
- Os níveis de p53 são controlados por dois reguladores críticos *upstream*, Mdm2 e p19^{ARF}.
- A atividade excessiva de E2Fs, que é desencadeada pela desregulação da via de pRb, resulta na ativação de ARF e, assim, de p53.
- A apoptose é um complexo programa de resposta celular que pode ser ativado por p53 assim como por sinais do lado de fora da célula.
- A apoptose envolve a ativação de uma cascata de caspases que resulta na destruição de uma célula, geralmente dentro de uma hora.
- A ativação da cascata apoptótica de caspase pode ser desencadeada por meio da abertura do canal na membrana externa da mitocôndria, a qual libera diversas proteínas pró-apoptóticas, notavelmente o citocromo *c*.
- A abertura do canal da membrana mitocondrial é determinada pelos níveis relativos de proteínas anti e pró-apoptóticas relacionadas à Bcl-2.
- A cascata apoptótica de caspase pode ser ativada por receptores de morte da superfície celular.
- A perda de funções apoptóticas permite que células cancerosas sobrevivam a uma variedade de estresses celulares fisiológicos, incluindo anoxia, desequilíbrios de sinalização, dano ao DNA e perda de ligação.
- As células cancerosas inventam numerosas maneiras de inativar a maquinaria apoptótica a fim de sobreviver e se desenvolver. Dentre essas estão incluídos a ativação dos disparos por Akt/PKB, o aumento nos níveis de proteínas antiapoptóticas relacionadas à Bcl-2, a inativação de p53 por meio de mudanças no gene *p53* ou reguladores *upstream* desta proteína, a metilação de promotores de uma variedade de genes pró-apoptóticos, a interferência no citocromo *c* liberado da mitocôndria e a inibição de caspases.

Questões elaboradas

1. Inspirando-se do fato de que vírus tumorais devem suprimir a apoptose de células infectadas a fim de se multiplicarem, quais são as estratégias moleculares que estão disponíveis para que eles o façam?
2. Quais os tipos de fatores que influenciam a decisão de p53 em agir de uma maneira citostática contra a pró-apoptótica?
3. Como uma terapêutica anticâncer pode ter sucesso em tratar células cancerosas que têm inativado componentes de sua maquinaria apoptótica? Dados os estresses fisiológicos que são conhecidos por ativar a apoptose induzida por p53, quais os tipos de drogas terapêuticas anticâncer podem ser criadas para o tratamento de células cancerosas?
4. Quais os efeitos colaterais que você preveria que poderiam resultar de uma inibição geral de apoptose em todos os tecidos do corpo?
5. Como a perda de componentes da maquinaria de apoptose pode resultar em células cancerosas mais suscetíveis a determinados tipos de morte celular do que as células normais?
6. Você poderia enumerar a série de estresses fisiológicos indutores de apoptose que as células cancerosas devem confrontar e tirar vantagem durante o curso do desenvolvimento tumoral?

Leitura adicional

- Ashkenazi A & Dixit VM (1998) Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281, 1305–1308.
- Bachrecke EH (2002) How death shapes life during development. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 779–787.
- Bartek J & Lukas J (2003) Chk1 and Chk2 kinase in checkpoint control and cancer. *Cancer Cell* 3, 421–429.
- Baserga R, Peruzzi F & Reiss K (2003) The IGF-1 receptor in cancer biology. *Int. J. Cancer* 107, 873–877.
- Bursch W (2001) The autophagosomal-lysosomal compartment in programmed cell death. *Cell Death Differ.* 8, 569–581.
- Calle EE & Kakas R (2004) Overweight, obesity, and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms. *Nat. Rev. Cancer* 4, 579–591.
- Calle EE, Rodriguez C, Walker-Thurmond K & Thun MJ (2003) Overweight, obesity, and mortality from cancer in a prospectively studied cohort of U.S. adults. *N. Engl. J. Med.* 348, 1625–1638.
- Cory S & Adams JM (2002) The Bcl-2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat. Rev. Cancer* 2, 647–656.
- Daniel NN & Korsmeyer SJ (2004) Cell death: critical control points. *Cell* 116, 205–219.
- Downward J (1998) Ras signalling and apoptosis. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 8, 49–54.
- El-Deiry WS (2003) The role of p53 in chemosensitivity and radiosensitivity. *Oncogene* 22, 7486–7495.
- Fürstenberger G & Senn H-G (2002) insulin-like growth factors and cancer. *Lancet Oncol.* 3, 298–302.
- Giaccia AJ & Kastan MB (1998) The complexity of p53 modulation: emerging patterns from divergent signals. *Genes Dev.* 12, 2973–2983.
- Ginsberg D (2002) E2F1 pathways to apoptosis. *FEBS Lett.* 529, 122–125.
- Giovannucci E (2003) Nutrition, insulin, insulin-like growth factors and cancer. *Horm. Metab. Res.* 35, 694–704.
- Green DR & Evan GI (2002) A matter of life and death. *Cancer Cell* 1, 19–30.
- Harris CC (1996) p53 tumor suppressor gene: from the basic research laboratory to the clinic—an abridged historical perspective. *Carcinogenesis* 17, 1187–1198.
- Hengartner MO (2000) The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407, 770–776.
- Hursting SD et al. (2003) Calorie restriction, aging and cancer prevention: mechanisms of action and applicability to humans. *Annu. Rev. Med.* 54, 131–152.
- Igney FH & Krammer PH (2002) Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat. Rev. Cancer* 2, 277–288.
- Karin M & Lin A (2002) NF- κ B at the crossroads of life and death. *Nat. Immunol.* 3, 221–227.
- Levine AJ (1997) p53 the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88, 323–331.
- Levine B & Klionsky DJ (2004) Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev. Cell* 6, 463–477.
- Lowe SW, Cepero E & Evan G (2004) Intrinsic tumour suppression. *Nature* 342, 307–315.
- Martinou JC & Green DR (2001) Breaking the mitochondrial barrier. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 63–67.
- Melino G, De Laurenzi V & Vousden KH (2002) p73: friend or foe in tumorigenesis. *Nat. Rev. Cancer* 2, 605–615.
- Michael D & Oren M (2003) The p53-Mdm2 module and the ubiquitin system. *Semin. Cancer Biol.* 13, 49–59.
- Nevins JR & Vogt PK (1996) Cell transformation by viruses. In Fields Virology, 3rd ed (BN Fields, DM Knipe, PM Howley eds), pp 301–343. Philadelphia: Lippincott–Raven.
- Pollak MN, Schernhammer ES & Hankinson SE (2004) Insulin-like growth factors and neoplasia. *Nat. Rev. Cancer* 4, 505–518.
- Reed JC (1999) Dysregulation of apoptosis in cancer. *J. Clin. Oncol.* 17, 2941–2953.
- Reed JC (2000) Mechanisms of apoptosis. *Am. J. Pathol.* 157, 1415–1530.
- Riddle DL and Gorski SM (2003) Shaping and stretching life by autophagy. *Dev. Cell* 5, 364–365.
- Robles AI, Linke SP & Harris CC (2002) The p53 network in lung carcinogenesis. *Oncogene* 21, 6898–6907.
- Salvesen GS & Duckett CS (2002) IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 401–410.
- Sharpless NE & DePinho RA (1999) The *Ink4a/Arf* locus and its two gene products. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 9, 22–30.
- Sherr CJ (2001) The *Ink4a/ARF* network in tumour suppression. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 731–737.
- Sherr CJ (2004) Principles of tumor suppression. *Cell* 116, 235–246.
- Sherr CJ & McCormick F (2002) The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell* 2, 103–112.
- Sherr CJ & Weber JD (2000) The ARF/p53 pathway. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 10, 94–99.
- Smith GD, Gunnell D & Holly J (2000) Cancer and insulin-like growth factor-I. *BMJ* 321, 847–848.
- Soussi T & Bérout C (2001) Assessing *TP53* status in human tumors to evaluate clinical outcome. *Nat. Rev. Cancer* 1, 233–240.
- Varley JM (2003) Germline *TP53* mutations and Li-Fraumeni syndrome. *Hum. Mutat.* 21, 313–320.
- Vaux DL, Cory S & Adams JM (1988) *Bcl-2* gene promotes haematopoietic cell survival and cooperates with *c-myc* to immortalize pre-B cells. *Nature* 335, 440–442.
- Vogelstein B, Lane B & Levin AJ (2000) Surfing the p53 network. *Nature* 408, 307–310.
- Vousden KH & Lu X (2002) Live or let die: the cell's response to p53. *Nat. Rev. Cancer* 2, 595–604.
- Zahir N & Weaver VM (2004) Death in the third dimension: apoptosis deregulation and tissue architecture. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 14, 71–80.
- Zamzami N & Kroemer G (2001) The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 67–71.



CAPÍTULO 10

Vida Eterna: Imortalização Celular e Tumorigênese

“A morte ocorre porque um tecido desgastado não pode sempre se renovar, e porque a capacidade para seu aumento por meio de divisão celular não é eterna e, sim, finita.”

August Weissmann, biólogo, 1881

Nos capítulos anteriores, verificamos um número de distintos traços apresentados por células cancerosas. Em alguns casos, esses traços são adquiridos por meio das ações de oncogenes ativados; em outros, traços celulares específicos de câncer podem ser seguidos pela perda de genes supressores de tumor. Como discutiremos no Capítulo 11, a aquisição desses traços neoplásicos por células humanas (e, assim, o desenvolvimento de um tumor humano clinicamente aparente) em geral requer várias décadas.

Durante esse extenso período de desenvolvimento, populações de células humanas passam por uma longa sucessão de ciclos de crescimento e divisão e assim evoluem para o estado de crescimento neoplásico. Essa extensa proliferação, entretanto, entra em conflito com uma propriedade fundamental de células humanas normais: elas são dotadas com uma capacidade de replicar somente um menor número de vezes. Uma vez que as populações de células humanas normais tenham esgotado a sua cota de duplicações permitidas, as células dessas populações cessam a proliferação e podem entrar em apoptose.

Esses fatos nos levam a uma simples e inescapável conclusão: com o objetivo de formar tumores, células cancerosas incipientes devem romper a barreira que normalmente limita seu potencial proliferativo. De algum modo, elas devem adquirir a capacidade de multiplicar para um número anormalmente grande de ciclos de crescimento e divisão e, então, elas podem completar as múltiplas etapas do desenvolvimento de tumor com sucesso.

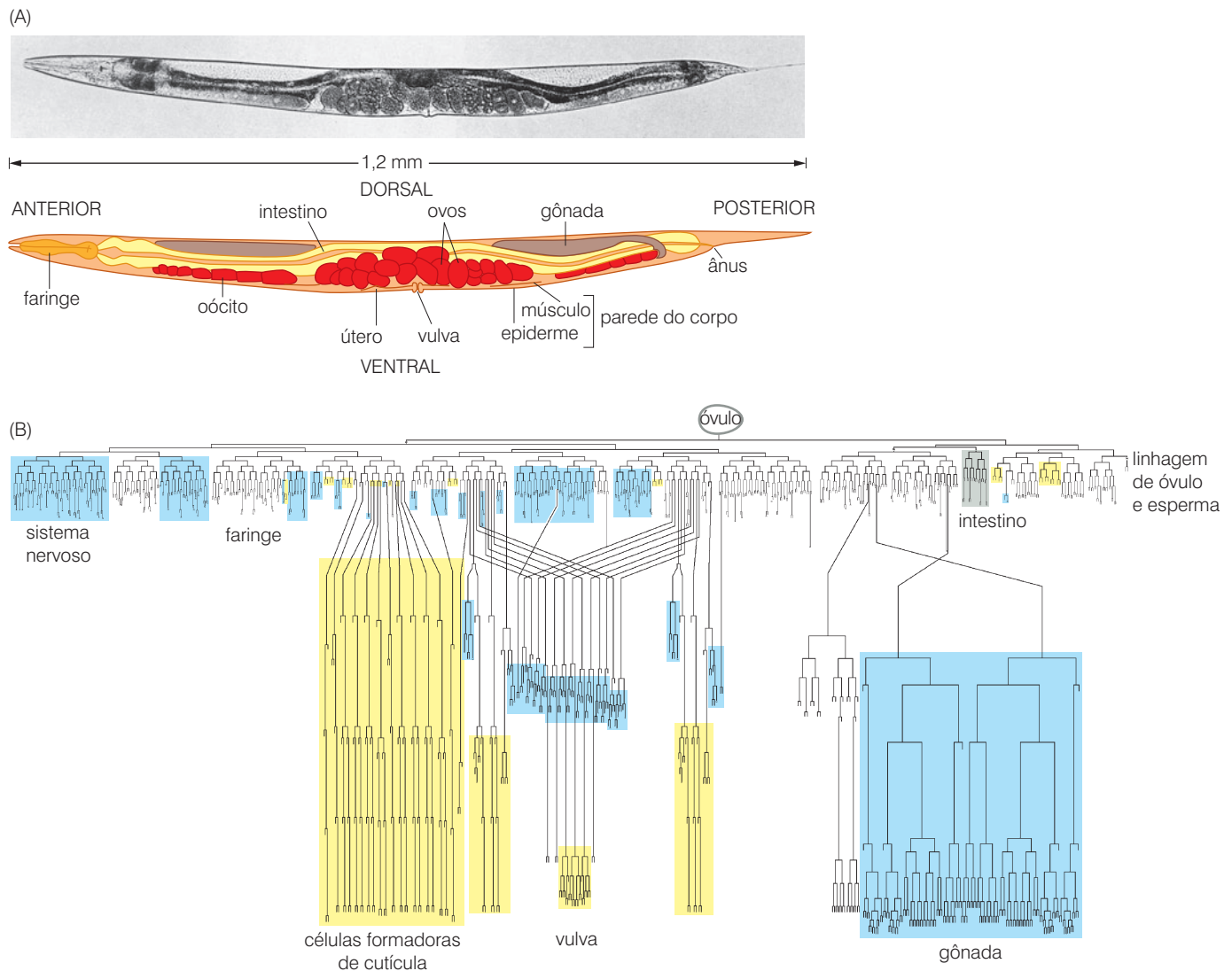


Figura 10.1 Árvore genealógica de células no corpo de um verme (A) O verme adulto *Caenorhabditis elegans* é composto de 959 células somáticas, e as linhas de descendentes de todas as células desse verme têm sido rastreadas com precisão de volta ao óvulo fertilizado. (B) Como é evidente, muitas das linhagens celulares terminam abruptamente, pois as células param de proliferar ou são descartadas (em geral por apoptose). As células em cada uma das principais ramificações são destinadas a formar um tecido específico. Por exemplo, células da principal ramificação multigeracional na direita são destinadas a formar as gônadas, enquanto aquelas em uma pequena seção na esquerda formarão o sistema nervoso. (A, de J. E. Sulston e H. R. Horvitz, *Dev. Biol.* 56: 110-156, 1977. © Academic Press; B, University of Texas Southwestern Medical Center.)

Neste capítulo, exploramos a natureza da maquinaria regulatória que limita a proliferação celular e como ela deve ser neutralizada a fim de que as células tornem-se completamente neoplásicas e formem tumores clinicamente detectáveis. Por meio da neutralização dessa maquinaria, as células ganham a habilidade de proliferar indefinidamente – o fenótipo de imortalidade celular. Essa imortalidade é um componente crítico do programa de crescimento neoplásico.

10.1 Populações celulares normais registram o número de gerações celulares separando-as de seus ancestrais no embrião jovem

Em animais multicelulares (metazoários) como nós, a origem de cada célula pode, em princípio, ser seguida por meio de gerações celulares múltiplas até um único ancestral – o óvulo fertilizado. Olhando em outra direção, a sequência de divisões celulares que se estende a partir de um ancestral celular que existiu em um embrião para uma célula descendente da qual existem muitas gerações celulares é frequentemente chamada de **linhagem celular**. Além disso, em um metazoário relativamente simples – o verme *Caenorhabditis elegans* –, a linhagem de todas as 959 células somáticas do corpo adulto tem sido seguida e pode ser descrita como uma árvore genealógica (Figura 10.1).

Em mamíferos complexos, entretanto, a montagem de uma árvore genealógica comparável nunca acontecerá, pois o número total de divisões celulares é astronômico: o corpo humano adulto, por exemplo, compreende quase 10^{14} células, e o organismo como um todo sofre tantas divisões celulares quanto 10^{16} em seu tempo de vida. Mas podemos imaginar que para cada corpo humano tal árvore genealógica celular exista, isso somente como uma teoria.

Como é o caso com *C. elegans*, durante o curso de desenvolvimento humano, células embrionárias iniciais tornam-se as fundadoras de linhagens celulares específicas que são responsabilizadas para assumir diversos fenótipos celulares tecido-específicos (Seção 8.11). Certamente, a ciência da biologia de desenvolvimento foca muito mais a sua atenção em como células individuais em diversas linhagens celulares adquirem a informação de seus vizinhos que cause a sua entrada em algum programa de diferenciação. Entretanto, biólogos de desenvolvimento não tratam de uma questão de grande relevância ao desenvolvimento de tumor: existem controles específicos que determinam o número de gerações celulares pelo qual uma linhagem celular em particular possa passar durante o tempo de vida de um organismo? Cada seção e ramo da árvore genealógica de uma célula podem crescer indefinidamente ou o número de gerações replicativas em cada linhagem celular é predeterminado e limitado?

Atualmente, técnicas avançadas não nos permitem determinar com precisão quantas vezes linhagens celulares específicas dentro do corpo humano ou murino passam por sucessivos ciclos de crescimento e divisão. Ainda, uma medida bruta da capacidade replicativa de uma linhagem celular pode ser realizada por meio de uma cultura celular de interesse *in vitro*. Por exemplo, fibroblastos podem ser preparados a partir de tecido vivo, introduzidos em uma placa de Petri, e, assim, é realizada a determinação de quantas vezes essas células duplicarão. (Na prática, tais experimentos requerem uma **passagem seriada**, na qual uma porção das células que completam a placa é removida e introduzida em uma segunda placa a fim de proliferarem, sendo transferidas a uma terceira placa e assim por diante.)

Como primeiramente demonstrado, no início dos anos 1960, células embrionárias humanas ou murinas exibem um número limitado de ciclos de replicação em cultura. O trabalho de Leonard Hayflick mostrou que as células parariam de crescer após um número aparentemente predeterminado de divisões e entrariam no estado chamado de **senescência replicativa** ou, simplesmente, **senescência** (Figura 10.2). Células senescentes permanecem metabolicamente ativas, porém parecem perder irreversivelmente a habilidade de reentrar no ciclo de divisão ativa. Tais células se espalharão em cultura de monocamada, adquirirão um grande citoplasma e persistirão por semanas, senão meses, tanto quanto lhes for dado nutrientes e fatores de crescimento; tais células são freqüentemente descritas como assumindo a aparência de um ovo frito (Figura 10.3). Os fatores de crescimento auxiliam na sustentação da viabilidade das células senescentes, porém não são capazes de obter a resposta proliferativa normal observada quando são aplicados a células saudáveis, não-senescentes. Assim como células em proliferação ativa, as células senescentes apresentam

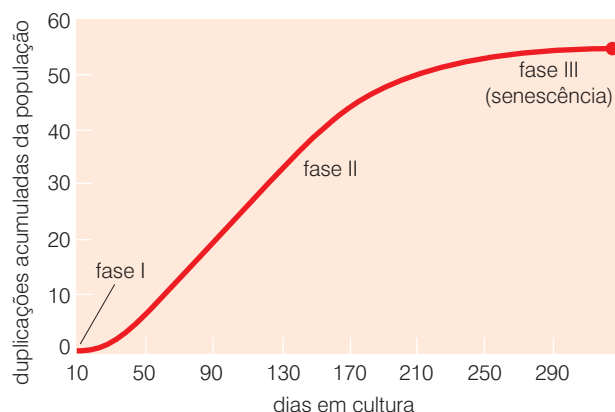
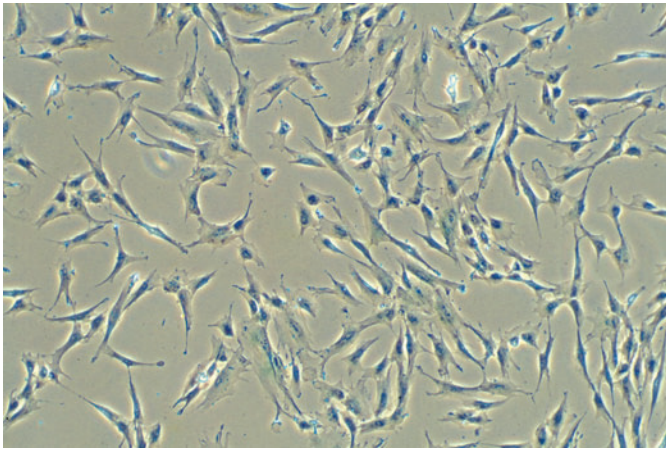
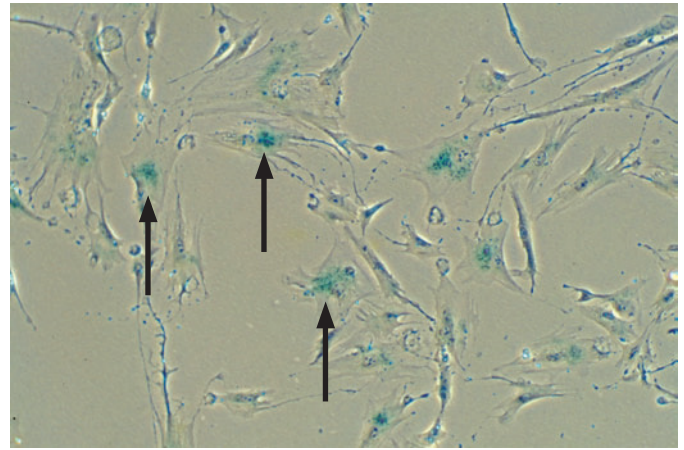


Figura 10.2 A capacidade proliferativa de células passadas extensivamente em cultura. A capacidade de fibroblastos humanos de proliferar em cultura foi avaliada no trabalho de Leonard Hayflick por meio da contagem do número de vezes que a população de células duplicou (*ordenada*). Como é aparente, essas células, iniciando logo após a explanação a partir de tecido vivo até a cultura (fase I), foram capazes de proliferar por aproximadamente 60 duplicações (fase II) antes de entrarem em senescência (fase III), na qual elas poderiam permanecer viáveis, porém não-proliferativas, por mais de um ano. (De J. W. Shay e W. E. Wright, *Nat. Ver. Mol. Cell Biol.* 1:72-76, 2000.)



(A)



(B)

Figura 10.3 Células senescentes *in vitro* e *in vivo* (A) Quando visualizados com microscópio de contraste de fase, fibroblastos humanos pré-senescentes ainda estão crescendo vigorosamente e retêm a aparência de células de primeira passagem. (B) Entretanto, uma vez que as células tenham entrado em senescência, elas cessam a proliferação, porém permanecem viáveis. Muitas delas desenvolvem citoplasmas extremamente grandes, dando a elas uma aparência de "ovo frito". (Estas duas micrografias foram produzidas no mesmo aumento.) Em adição, células senescentes expressam, caracteristicamente, a enzima β -galactosidase ácida associada à senescência, que pode ser detectada por meio da suplementação com um substrato que se torna *azul* sob a clivagem por essa enzima (*setas*); em contraste, células de primeira passagem verificadas em (A) mostram uma coloração muito fraca. (Cortesia de C. Scheel.)

receptores de fatores de crescimento, porém as vias de sinalização *downstream* têm sido inativadas por mecanismos ainda não esclarecidos.

O número preciso de duplicações replicativas exibido por células em cultivo, antes de alcançarem a senescência, depende das espécies das quais as células foram preparadas, da origem tecidual e da idade do organismo doador. Alguns experimentos com células humanas indicam que células preparadas a partir de embriões ou recém-nascidos são capazes de duplicar um maior número de vezes em cultura (p. ex., 50 a 60 duplicações de população, ou PDs) do que células retiradas de adultos de meia-idade ou idosos (Figura 10.4). Tal comportamento sugere, porém dificilmente prova (Barra lateral 10.1), que células de indivíduos mais velhos já utilizaram parte de sua cota de duplicações replicativas antes de serem introduzidas em cultura de tecido.

Um comportamento contrastante é demonstrado por células-tronco embrionárias (ES), as quais são preparadas a partir de embriões bastante novos e retêm a capacidade, sob condições apropriadas, de produzir todas as linhagens diferenciadas no corpo (Barra lateral 8.1). Quando abastecidas com os nutrientes apropriados, essas células demonstram um potencial replicativo ilimitado em cultura e, assim, são ditas **imortais**. (O termo é um pouco equivocado, já que é, na verdade, uma *linhagem* de células ES que é imortal, e não células ES individuais.)

Juntas, essas várias observações conduzem ao pensamento de que, muito cedo na embriogênese, as células possuem uma capacidade replicativa ilimitada. Entretanto, como linhagens específicas de células no organismo (fibroblastos dérmicos, neurônios, células epiteliais mamárias) são formadas, cada uma parece estar distribuída em um número predeterminado de duplicações pós-embriônicas. O comportamento replicativo de células cancerosas assemelha-se, no mínimo superficialmente, àquele de células ES. Quando muitos tipos de células cancerosas são propagados em cultura, elas parecem capazes de proliferar para sempre quando abastecidas com condições apropriadas de cultivo *in vitro*.

Esse comportamento é ilustrado mais dramaticamente por células HeLa. Desde a metade do século passado, essas células cultivadas têm sido o tipo celular humano mais frequentemente utilizado para o estudo da biologia molecular de células humanas. Elas foram derivadas em 1951 a partir de um adenocarcinoma cervical incomum, particularmente agressivo, descoberto em Henrietta Lacks, uma jovem de Baltimore, Maryland, que logo morreu de complicações desse tumor. Desde essa época, essas células têm proliferado em cultura em centenas de laboratórios em todo o mundo, dividindo-se cerca de uma vez ao dia. As células HeLa constituem uma **linhagem celular**, na qual elas se tornam estabelecidas em cultura e podem ser repassadas indefinidamente, em contraste a muitas populações celulares que apresentam uma capacidade replicativa limitada após serem removidas do tecido vivo.

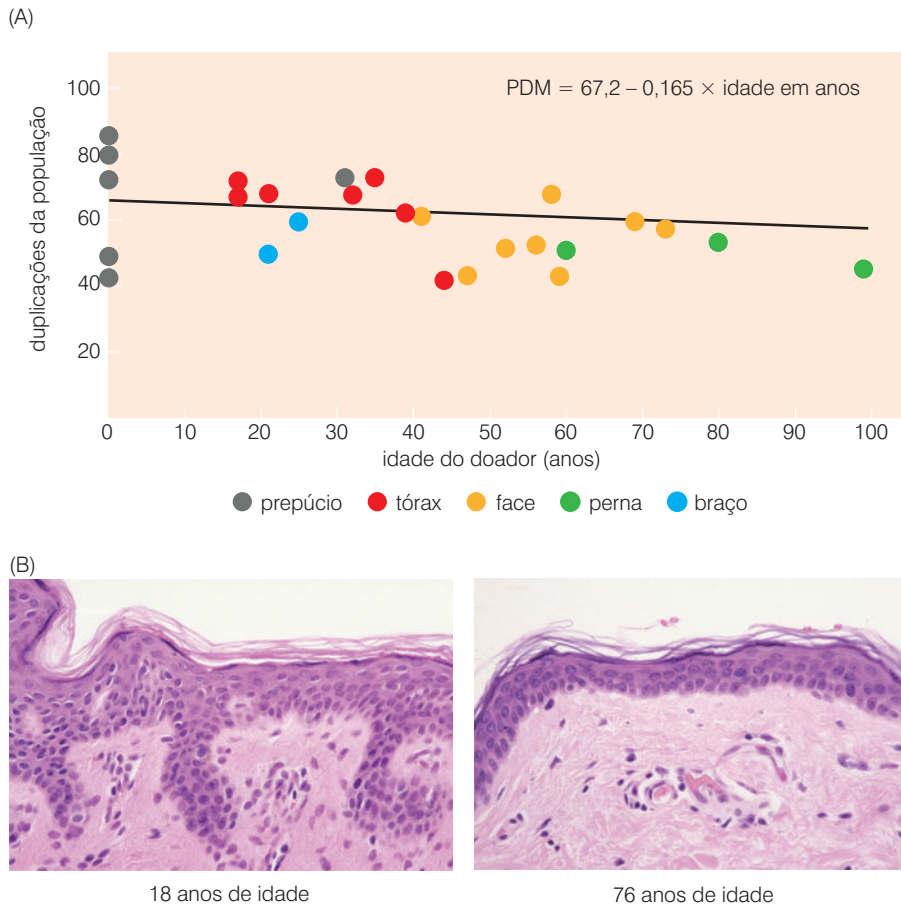


Figura 10.4 A perda da capacidade proliferativa com a idade (A) A capacidade proliferativa de células pode ser avaliada por meio da determinação do número de vezes que culturas de tais células irão duplicar em número de célula *in vitro* (média de duplicações de população, PDM). Aqui, duplicações de fibroblastos dérmicos preparados a partir de diversos locais anatômicos foram medidas em função da idade dos doadores. (Em virtude da variabilidade interindividual na capacidade proliferativa celular, os dados de tais medidas mostram uma dispersão substancial em torno da média de cada idade.) (B) Como as células-tronco dos queratinócitos da pele perdem a capacidade proliferativa com o passar da idade, a capacidade total da pele de se regenerar diminui, levando a uma diminuição da camada de queratinócitos da pele (*rosa-escuro*) e a uma perda da arquitetura rígida verificada na pele mais jovem. A pele de uma mulher de 18 anos de idade protegida com filtro solar (*esquerda*) é comparada com a pele de outra mulher de 76 anos de idade (*direita*). (A, cortesia de J. G. Rheinwald e T. M. O'Connell-Willstaedt; B, cortesia de T. Brenn.)

10.2 Células cancerosas necessitam se tornar imortais para a formação de tumores

A observação de que células cancerosas, uma vez adaptadas ao crescimento em cultura de tecidos (Barra lateral 10.2), são, freqüentemente, imortais, sugere que a imortalização é um componente integral da transformação de células cancerosas para um estado de crescimento neoplásico, ou seja, que as células cancerosas são imortais porque necessitam ser, caso queiram realizar a formação de um tumor.

Por que, de modo oposto, as linhagens de células normais não apresentam propriedades de crescimento imortalizado? Talvez o corpo dote suas células normais com um número limita-

Barra lateral 10.1 Por que as culturas de células de pessoas mais velhas proliferam menos do que aquelas de pessoas mais jovens? A explicação mais simples para a observação (veja a Figura 10.4) de que células de idosos param de proliferar *in vitro* mais cedo do que células de jovens é que as populações celulares mais velhas já passaram por mais ciclos de divisão celular *in vivo* e, dessa forma, esgotaram uma porção de suas duplicações permitidas. Na verdade, outras explicações são igualmente plausíveis. Por exemplo, células que não estão em divisão dentro de um tecido vivo podem sustentar danos por um extenso período; esse dano acumulado pode ser causado, por exemplo, pela exposição, a longo prazo, a espécies reativas de oxigênio (ROS), as quais são capazes de danificar muitos componentes celulares. Nesse caso, a subsequente perda da capacidade proliferativa observada *in vitro* pode ser proporcional ao tempo transcorrido desde que as células foram primeiramente formadas e pode não estar relacionado com o número de gerações celulares que seus ancestrais passaram durante o tempo de vida do organismo.

Barra lateral 10.2 Células cancerosas freqüentemente falham em se adaptar à cultura Células que são extraídas de uma variedade de tecidos normais e são introduzidas em cultura de tecido com freqüência não se adaptam prontamente às condições de cultura *in vitro*. Isso é aplicado a muitos tipos de células cancerosas. Assim como células normais, a maioria dos tipos de células cancerosas depende de vários outros tipos celulares para apoiar a sua viabilidade e proliferação, como aprenderemos em maior detalhe no Capítulo 13. Isso complica tentativas de determinar se certas populações de células cancerosas são imortalizadas, já que as tentativas iniciais em propagar essas células em cultura têm geralmente falhado. Como consequência, as conclusões sobre a imortalidade de células cancerosas são baseadas na proporção relativamente pequena de tumores humanos que carregam células, que prontamente se adaptaram às condições de cultura *in vitro* e, desde então, têm proliferado indefinidamente.

do de gerações replicativas como um mecanismo de defesa anticâncer. Por exemplo, se uma célula do corpo acidentalmente adquirir determinados oncogenes e perder genes supressores de tumor críticos, seus descendentes iniciariam uma proliferação descontrolada, e a população destas células tumorais poderia aumentar exponencialmente. Entretanto, se dotadas de um limitado potencial replicativo, essas células podem esgotar suas cotas de duplicações celulares antes de realizarem a formação de uma massa tumoral que apresente risco de morte; como consequência, o desenvolvimento do tumor sofreria uma parada.

A credibilidade desse modelo depende de alguns números importantes. Especificamente, precisamos saber quantas gerações celulares sucessivas são necessárias para produzir um tumor humano clinicamente detectável (Figura 10.5A) e quantas gerações são permitidas para linhagens celulares normais no corpo. Sabemos que tumores humanos são clonais, no sentido de que todas as células neoplásicas da massa tumoral descendem de um ancestral celular em comum que sofreu transformação em um ponto de sua vida (Seção 2.5). Com isso em mente, podemos perguntar quantas gerações celulares separam as células tumorais em um grande tumor humano de seus progenitores em comum.

A aritmética funciona da seguinte maneira. O volume de um centímetro cúbico (cm^3) dentro de uma massa de células tumorais contém em torno de 10^9 células, e um tumor que ameace a vida possui um tamanho de 10^3 cm^3 . Podemos calcular que essas 10^{12} células parecem ter surgido após 40 ciclos de crescimento e divisão exponencial (Figura 10.5B) – ou seja, 40 gerações celulares separam a célula fundadora de suas descendentes do estágio final de tumor altamente agressivo ($10^3 \cong 2^{10}$; portanto $10^{12} \cong 2^{40}$).

Entretanto, como mencionado anteriormente, alguns tipos de células humanas normais são conhecidos por passarem por 50 a 60 ciclos de crescimento e divisão em cultura antes de se tornarem senescentes e pararem de crescer. De acordo com a aritmética exposta anteriormente, essas 50 ou 60 gerações celulares de crescimento exponencial estão além do que o necessário para que uma célula fundadora gere descendentes suficientes para constituir uma massa tumoral que ameace a vida. Realmente, 60 duplicações celulares são suficientes para criar uma massa tumoral de cerca de 10^{18} células $\cong 10^9 \text{ cm}^3 \cong 10^6$ quilogramas. Algo está drasticamente errado com esses números!

O erro em nossos cálculos reside em uma premissa falha: eles assumem uma expansão exponencial de populações de células cancerosas (Figura 10.5A e B). A realidade biológica de crescimento de tumor é muito diferente. Assim, um número de mecanismos de defesa, desenvolvidos dentro dos tecidos do corpo, torna a vida muito difícil para células cancerosas incipientes – tão difícil que em cada geração celular um número significativo dessas células morre (Figura 10.5C). No início do desenvolvimento de tumor, os mecanismos de defesa postos em prática por tecidos incluem células tumorais desprovidas de fatores de crescimento, de oxigênio adequado e da capacidade de eliminar lixos metabólicos por meio da vasculatura. Além disso, vários mecanismos de defesa celular antitumor do circuito regulatório altamente conectado de células atua para eliminar células pré-malignas de comportamento aberrante (Capítulo 9). Como uma consequência do atrito resultante em cada geração celular, a

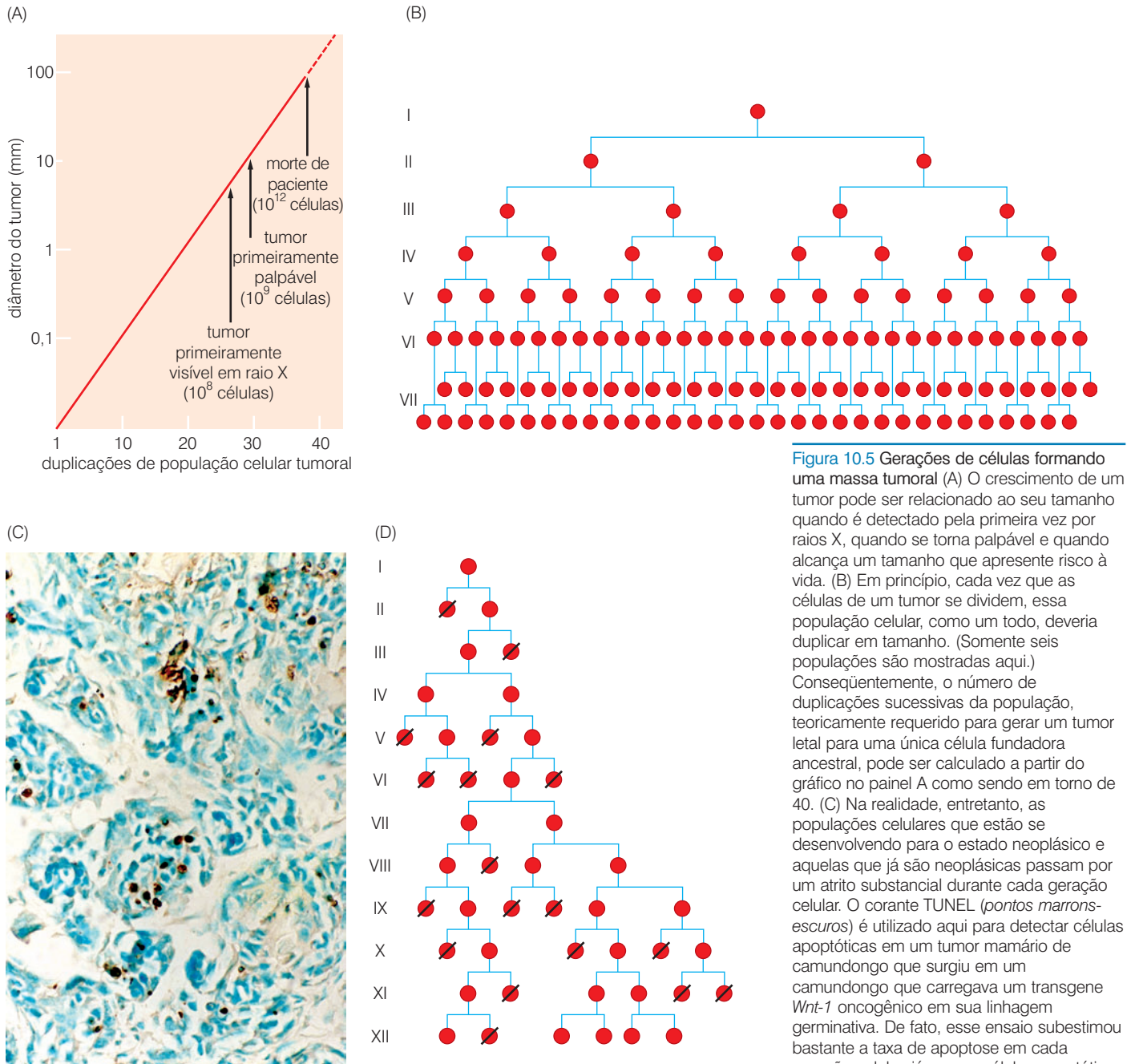


Figura 10.5 Gerações de células formando uma massa tumoral (A) O crescimento de um tumor pode ser relacionado ao seu tamanho quando é detectado pela primeira vez por raios X, quando se torna palpável e quando atinge um tamanho que apresente risco à vida. (B) Em princípio, cada vez que as células de um tumor se dividem, essa população celular, como um todo, deveria duplicar em tamanho. (Somente seis populações são mostradas aqui.) Conseqüentemente, o número de duplicações sucessivas da população, teoricamente requerido para gerar um tumor letal para uma única célula fundadora ancestral, pode ser calculado a partir do gráfico no painel A como sendo em torno de 40. (C) Na realidade, entretanto, as populações celulares que estão se desenvolvendo para o estado neoplásico e aquelas que já são neoplásicas passam por um atrito substancial durante cada geração celular. O corante TUNEL (pontos marrons-escuros) é utilizado aqui para detectar células apoptóticas em um tumor mamário de camundongo que surgiu em um camundongo que carregava um transgene *Wnt-1* oncogênico em sua linhagem germinativa. De fato, esse ensaio subestimou bastante a taxa de apoptose em cada geração celular, já que as células apoptóticas persistem somente por uma hora antes de serem consumidas por células vizinhas e por macrófagos. (D) A alta taxa de atrito leva à perda de muitas células em cada geração celular (traços diagonais).

árvore genealógica de células em uma massa tumoral, na verdade, parece completamente diferente (Figura 10.5D). Muitos ramos da árvore estão sendo continuamente podados pela alta taxa de mortalidade de células tumorais em cada geração.

Esse desgaste progressivo significa que o número de gerações celulares necessárias para formar uma massa tumoral de um determinado tamanho é muito maior do que seria previsto por simples cinéticas de crescimento exponencial. Por exemplo, uma população clonal de 10^3 células tumorais pode ser idealizada, com base em seu tamanho, como tendo passado por 10 ciclos de crescimento e divisão exponencial desde sua fundação por uma ancestral; na realidade, 20, 30 ou mais gerações celulares podem ter sido necessárias para acumular essa quantidade de células.

Conseqüentemente, uma célula fundadora ancestral que deveria ter gerado 2^{11} descendentes deixa somente cinco descendentes na 12ª geração. O número necessário de gerações celulares sucessivas para gerar um tumor de tamanho que apresente risco de morte é, dessa maneira, maior e, na ausência de um conhecimento preciso das taxas de atrito, incalculável. (A, de B. Alberts *et al.*, Molecular Biology of the Cell, 4th ed. New York: Garland Science, 2002; C, cortesia de L. D. Attardi e T. Jacks.)

Esses cálculos revisados fornecem credibilidade para o conhecimento de que o corpo humano dota suas linhagens celulares com um número limitado de ciclos de crescimento e divisão a fim de se proteger contra o desenvolvimento de tumores. Por exemplo, se populações celulares devem passar por 100 gerações replicativas a fim de formar um tumor humano clinicamente detectável, é provável que a maioria das populações celulares tumorais incipientes utilizarão suas cotas normais de 50 a 60 divisões celulares antes de iniciar a criação de tal massa.

Tendo aceitado, ao menos por enquanto, esse argumento e suas conclusões, estamos deixando alguns enigmas importantes: como as células podem recordar sua história replicativa? E como células cancerosas aspirantes apagam a memória de sua história e adquirem a capacidade de proliferar indefinidamente, ou no mínimo tanto quanto é necessário, para formar um tumor macroscópico clinicamente detectável?

Uma solução para o problema da história replicativa deve, mais cedo ou mais tarde, ser descoberta em termos das ações de moléculas específicas dentro das células. Qualquer que seja sua natureza, a solução dificilmente é óbvia. Organismos complexos como humanos não possuem um relógio biológico inato para a contagem do número de gerações (orgânica) que separam cada um de nós dos ancestrais que viveram 100 ou 1 mil anos atrás. Quando desejamos conhecer o número dessas gerações sobre extensos períodos, geralmente contratamos geneticistas para mapeá-los. Nenhum dispositivo de contagem biológica dentro de nossos corpos pode nos fornecer tais respostas. Como, então, entidades biológicas mais simples – células humanas individuais – podem manter a trilha de suas gerações?

Além disso, é provável que esse mecanismo de contagem de gerações seja, na linguagem de biólogos de desenvolvimento, **celular-autônomo**; isto é, ele deve ser intrínseco a uma célula, e não influenciado por interações existentes entre a célula e suas vizinhas e o corpo como um todo. Lembre a contrastante situação de oncogenes e genes supressores de tumor. Os produtos da maioria desses genes perturbam as vias responsáveis pelo processamento de sinais recebidos pelas células de seus arredores – processo celular não-autônomo. Finalmente, o dispositivo de contagem de gerações hipotético deve ser relativamente estável bioquimicamente, pois necessita guardar um registro da história passada de uma linhagem celular de forma que sobreviva a extensos períodos, com frequência, muitas décadas.

Em princípio, o processo de contagem desse “relógio de gerações” (que conta as gerações celulares decorridas em vez do tempo decorrido) pode depender das concentrações de alguma molécula intracelular solúvel que (1) é sintetizada inicialmente no desenvolvimento, e não depois; (2) está presente em altas concentrações nas células embrionárias que são os ancestrais para diversas linhagens; e (3) sofre diluição progressiva por um fator de 2 a cada vez que uma célula se divide em uma linhagem. A senescência pode ser desencadeada após os níveis desse composto caírem abaixo de seu nível inicial. Pensamento plausível aos matemáticos, esse ajuste não pode atuar no mundo real da biologia. A bioquímica diz que nenhuma molécula pode estar presente em uma célula com uma escala de concentração que vai de 2^{50} a 2^{60} .

Isso forçou os pesquisadores a olharem outra parte das incorporações moleculares do relógio de gerações. Eles recaíram sobre dois mecanismos regulatórios que governam a capacidade replicativa de células em crescimento *in vitro* e, possivelmente, *in vivo*. O primeiro desses parece medir o estresse fisiológico cumulativo que linhagens celulares experimentam em extensos períodos e, assim, pára a proliferação uma vez que o dano exceda um determinado ponto; isso causa a entrada das células no estado de senescência.

O segundo regulador mede por quantas gerações replicativas uma linhagem celular passou e soa um alarme mais drástico uma vez que a cota permitida de duplicações replicativas tenha sido utilizada; isso leva ao estado chamado **crise**, o qual resulta na morte apoptótica da maioria das células da população. Trataremos, primeiramente, dos mecanismos indutores de senescência, e, após, descreveremos aqueles que governam a crise.

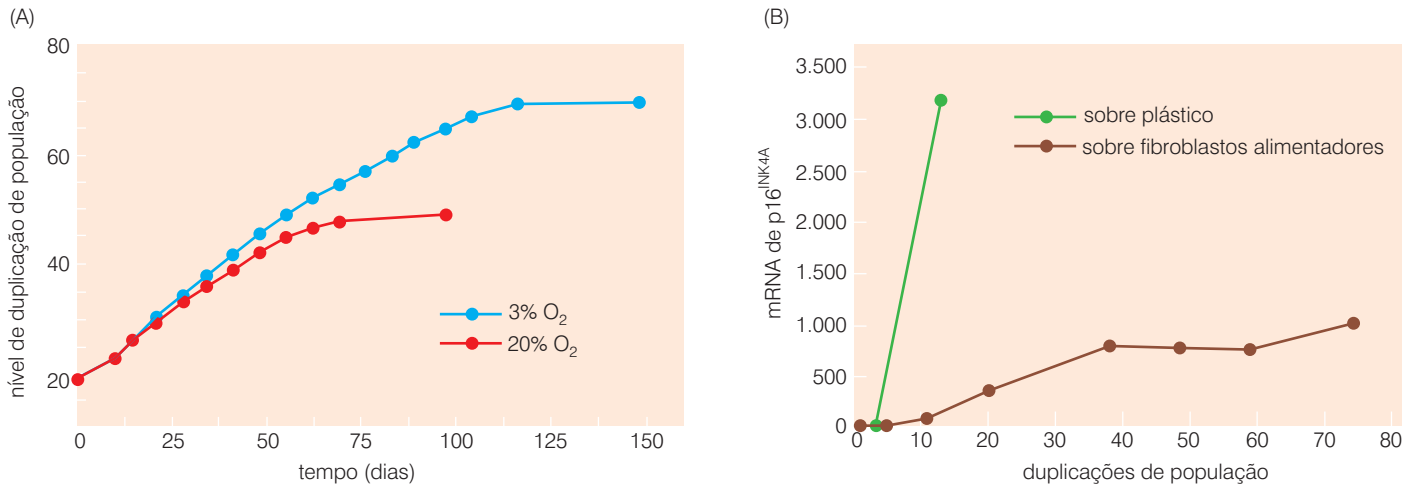


Figura 10.6 Influência das condições de cultura no princípio de senescência (A) A capacidade proliferativa de populações celulares (nível de duplicação de população, *ordenada*) foi medida quando elas foram expostas em cultura a 3% ou 20% de oxigênio. A concentração de 3% de oxigênio é mais fisiológica, já que reflete a concentração de oxigênio que as células experimentam em tecidos vivos. (B) A dependência de células epiteliais normais pelo suporte biológico do estroma cria um estresse adicional quando tais células são propagadas *in vitro*. Quando crescidas como culturas puras, queratinócitos de prepúcio humano induzem rapidamente a expressão da proteína supressora de tumor p16^{INK4A} (*linha verde*; veja a Seção 8.4), a qual logo impõe a parada de crescimento e a senescência dessas células. Entretanto, quando essas células epiteliais são crescidas em cima de uma camada alimentadora de fibroblastos (*linha marrom*), elas podem proliferar por um extenso período sem passarem por uma forte indução de p16^{INK4A} e senescência resultante. (A, de Q. Chen, A. Fischer, J. D. Reagan *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 4337-4341, 1995; B, de B. Fu, J. Quintero e C. C. Baker, *Cancer Res.* 63: 7815-7824, 2003.)

10.3 O estresse fisiológico celular impõe uma limitação na replicação

Evidências para as causas de senescência replicativa vêm de experimentos nos quais as condições de cultura *in vitro* são variadas. As observações mais dramáticas derivam de experimentos em que a tensão de oxigênio a qual as células em cultivo são expostas tem sido reduzida de 20% para 1 a 3%; isso resulta no aumento substancial da extensão da vida replicativa *in vitro*. Em um conjunto de experimentos, populações de fibroblastos diplóides humanos apresentaram uma extensão mais longa de vida do que 20% (ou seja, foram 20% mais duplicações) em cultura quando crescidas em 1% de oxigênio do que em 20% de oxigênio; em outro, as células apresentaram 50% mais duplicações quando cultivadas em 3% de oxigênio do que quando cultivadas com 20% de oxigênio (Figura 10.6A). As tensões mais baixas de oxigênio refletem melhor as tensões de oxigênio que a maioria das células experimenta em tecidos vivos, melhor do que a tensão que é mais convenientemente fornecida às células em uma incubadora de cultura de tecidos. Além disso, no caso de células epiteliais, a presença de uma camada alimentadora de estroma causa profundos efeitos na capacidade dessas células de sobreviverem e proliferarem em cultura (Figura 10.6B).

A contribuição do dano oxidativo cumulativo para a senescência também é sugerida por outros tipos de evidências. Por exemplo, células senescentes cultivadas produzem formas oxidadas de guanina quatro vezes mais em relação a taxa de células jovens, sugerindo uma progressiva avaria da função mitocondrial durante a cultura *in vitro*, um escapamento resultante de espécies reativas de oxigênio (ROS) da mitocôndria e o acúmulo de grandes números de lesões induzidas por oxidação nessas células. Muitas das lesões que induzem senescência são encontradas no DNA cromossomal de células.

Provocativamente, os níveis de dois importantes inibidores de CDKs supressores de crescimento – p16^{INK4A} e p21^{Cip1} – aumentam progressivamente em uma variedade de tipos celulares humanos durante a extensa cultura *in vitro* (Figura 10.7A). Além disso, variantes de queratinócitos humanos que escapam da senescência inicial *in vitro* frequentemente carregam cópias inativadas do gene que codifica a proteína supressora de tumor p16^{INK4A}. Como verificamos anteriormente, uma vez presente acima de um certo nível, p16^{INK4A} bloqueia a fosforilação de pRb por ciclinas do tipo D e CDK4/6, e a pRb hipofosforilada resultante pode atuar com o objetivo de parar a proliferação (Seção 8.4). De maneira similar, p21^{Cip1} pode parar a progressão do ciclo celular, porém apresenta uma ação mais ampla, já que essa pode bloquear a sinalização realizada por todas as cinases dependentes de ciclina envolvidas na progressão através das fases G₁ (final), S, G₂ e M do ciclo celular.

A expressão ectópica de p16^{INK4A} (Figura 10.7B) em células causa o desenvolvimento dos muitos atributos de senescência replicativa. Essas e outras observações indicam que as células

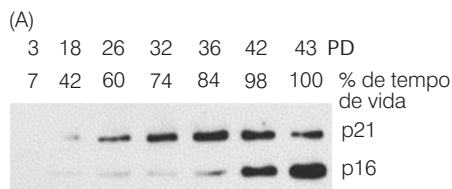
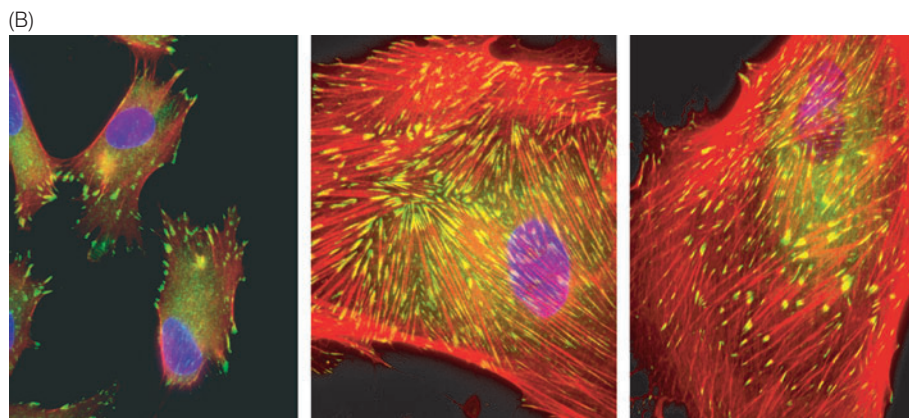


Figura 10.7 Indução de proteínas supressoras de tumor durante a cultura *in vitro* (A) Quando fibroblastos endometriais humanos de adulto são propagados *in vitro*, a expressão das proteínas p16^{INK4A} e p21^{Cip1} é induzida, embora com cinéticas distintas. Essas células apresentam uma duração de vida esperada de 40 a 43 duplicações de população (PD) em cultura, e, portanto, entram em senescência. (B) Células normais (esquerda) são relativamente pequenas e têm pouco contato com o substrato (amarelo) e relativamente poucas fibras de actina (laranja), em contraste com as células senescentes (centro e direita). A expressão ectópica de p16^{INK4A} é capaz de induzir um fenótipo celular (centro) que é indistinguível daquele de células que entraram em senescência replicativa (direita). Esse efeito pode depender de sua capacidade de inibir CDK4 e CDK6, bloqueando, dessa forma, a fosforilação de pRb. (A, de S. Brookes, J. Rowe, A. Gutierrez Del Arroyo et al., *Exp. Cell Res.* 298: 549-559, 2004; B, cortesia de I. Ben-Porath.)

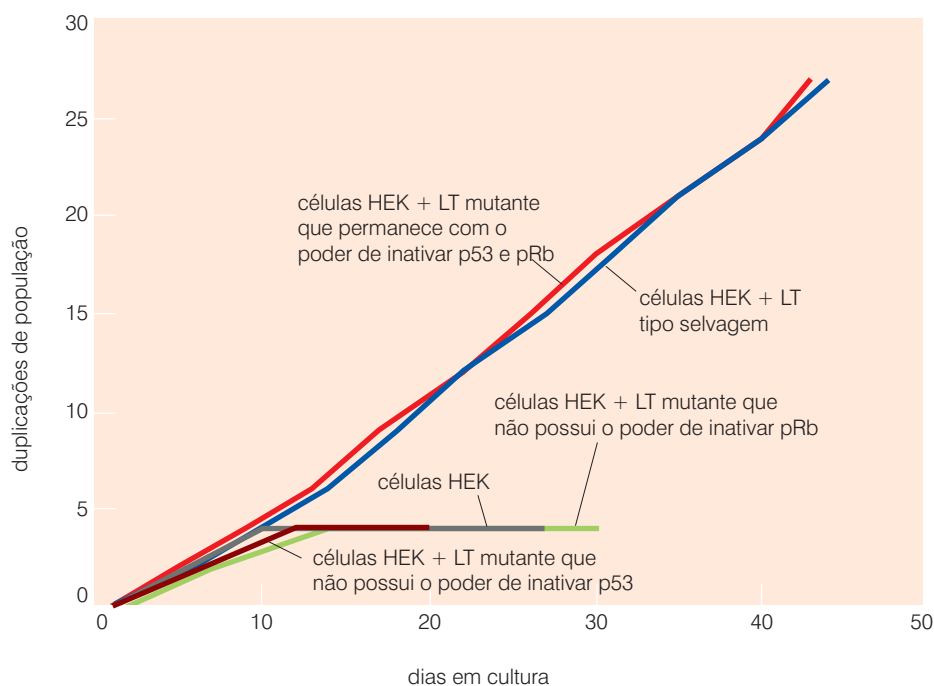


respondem aos estresses de cultura *in vitro* por meio da indução da expressão de inibidores CDK chave; uma vez induzidas, essas proteínas forçam as células a assumirem muitos dos atributos associados ao estado senescente. Significativamente, a senescência inicial de queratinócitos humanos cultivados pode ser evitada por meio da expressão ectópica de altos níveis de CDK4 nessas células; essa cinase dependente de ciclina serve para sequestrar p16^{INK4A} (veja a Figura 8.13), prevenindo, assim, essa da parada da proliferação celular e a indução de senescência.

Como indicado na Figura 10.7A, a indução da expressão de p21^{Cip1} também pode ocorrer, assim como em células que se aproximam da senescência. Em tais células senescentes, a indução de p21^{Cip1} é mediada por níveis e atividade elevados da proteína supressora de tumor p53. Em algumas células, como fibroblastos embrionários de camundongo (MEFs), os níveis de p53 aumentam 10 a 14 vezes, assim como em células próximas à senescência. Uma vez induzida, p53 parece atuar de uma maneira citostática (via p21^{Cip1}) para segurar a proliferação celular adicional; assim como p16^{INK4A} (veja a Figura 10.7B), a expressão ectópica de p21^{Cip1} tem sido relatada na indução do fenótipo celular senescente.

Figura 10.8 Papel do antígeno "large T" na circunvenção da senescência

Experimentos com uma variedade de tipos celulares humanos indicam que a inativação de pRb e p53 é necessária para assegurar que essas células não entrem em senescência em cultura. Isso pode ser alcançado por meio da expressão do antígeno "large T" (LT) de SV40 nessas células. Como visto aqui, células de rim embrionário humano (HEK) entram em senescência após 10 a 12 duplicações de população (PDs) em cultura (linha cinza). Entretanto, se elas expressarem a proteína LT tipo selvagem (linha azul-escuro) ou um mutante de LT que permanece com a capacidade de ligar e sequestrar p53 e pRb (linha vermelha), elas enganam a senescência e continuam a proliferar por um extenso período. Mutantes de LT que perderam a capacidade de sequestrar p53 (linha marrom) ou pRb (linha verde-claro) falham na prevenção da senescência. (De W. C. Hahn, S. K. Dessain, M. W. Brooks et al., *Mol. Cell Biol.* 22: 2111-2123, 2002.)



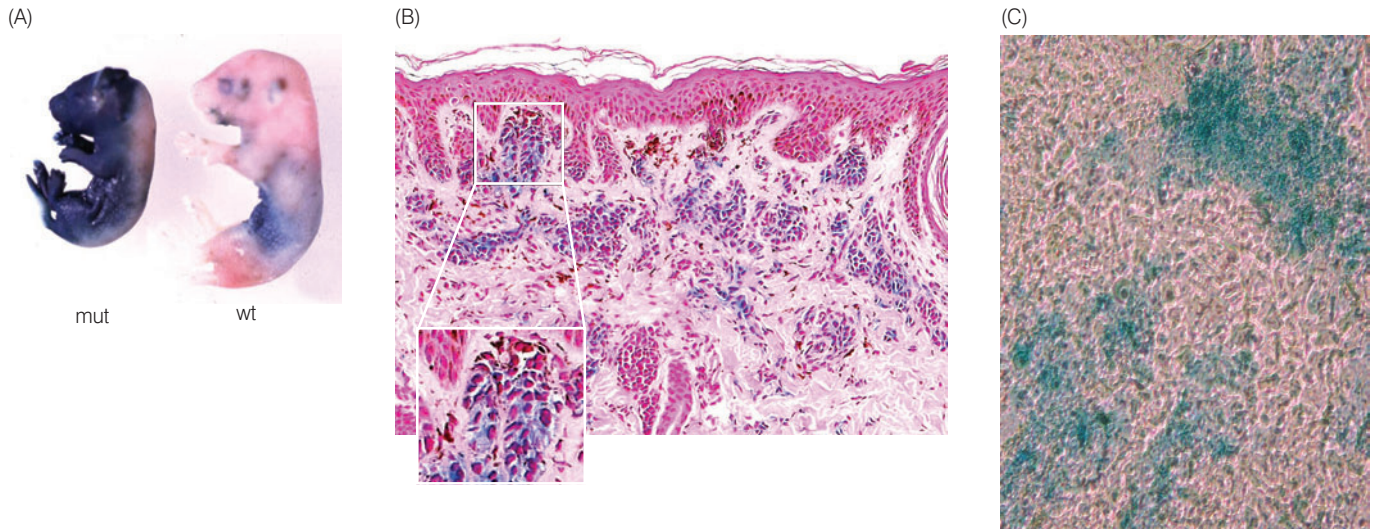


Figura 10.9 Evidências de células senescentes em tecidos vivos A existência de células senescentes *in vivo* é sugerida por diversas linhas de evidência. (A) Embriões de camundongo que são mutantes homozigotos no loco *Brca1*, que está envolvido na manutenção da integridade genômica, têm sido produzidos (Seção 12.10). Como consequência, células por todos esses embriões (mut, esquerda) sofrem extensos danos genômicos, causando o registro de suas células como senescentes (azul) por meio do ensaio para a enzima β -galactosidase associada à senescência (SA- β -gal) (veja a Figura 10.3), em contraste a embriões do tipo selvagem (wt, direita), em que tais células senescentes não estão evidentes. (B) A presença de melanócitos humanos senescentes dentro de verrugas displásticas (precursores benignos de melanomas) também pode ser demonstrada pela marcação com SA- β -gal (azul; ver a inserção). (C) O tratamento de tumores com drogas quimioterápicas também parece induzir a senescência em células tumorais, como avaliado pela coloração azul com o corante SA- β -gal específico à senescência. Aqui se verifica uma porção de um carcinoma de pulmão de um paciente que foi tratado com as drogas carboplatina e taxol antes da excisão cirúrgica do tumor. O tecido pulmonar normal mostrou raros traços de células coradas com SA- β -gal. (A, de L. Cao, W. Li, S. Kim, S. G. Brodie e C. -X. Deng, *Genes Dev.* 17: 201-213, 2003; B, cortesia de D. Peeper; C, de R. S. Roberson, S.J. Kussick, E. Vallieres et al., *Cancer Res.* 65: 2795-2803, 2005.)

Podemos imaginar que o ambiente vivenciado por células pré-neoplásicas e neoplásicas dentro dos tecidos as força a se adaptarem a uma variedade de estresses fisiológicos similares àqueles sofridos por células em cultura. Certamente, as mesmas vias de sinalização – pRb e p53 – que devem ser inativadas a fim de evitar a senescência *in vitro* (Figura 10.8) também são inativadas na grande maioria de tumores humanos, como verificamos nos Capítulos 8 e 9. Consequentemente, quando células cancerosas são extraídas de tumores e transferidas para cultura de tecidos, a prévia inativação de suas vias *Rb* e *p53* podem auxiliá-las a resistirem a muitos dos estresses impostos pelas condições de cultura *in vitro*, evitando, assim, a senescência.

Em acordo com essa idéia está a observação de que a senescência de fibroblastos humanos de primeira passagem e células epiteliais, ambos cultivados, pode ser evitada se a oncoproteína “large T” de SV40 for expressa nessas células (veja a Figura 10.8). Por meio do sequestro de ambas as proteínas supressoras de tumor, p53 e pRb, a proteína “large T” é capaz de neutralizar os circuitos celulares regulatórios chave que impõem a senescência em resposta ao estresse celular fisiológico.

Como pesquisadores têm planejado condições de cultura celular que mais se aproximam às condições vivenciadas pelas células dentro dos tecidos, a meia-vida de linhagens celulares em cultura tem aumentado progressivamente, e a senescência *in vitro* pode ser atrasada e, em determinados casos, completamente evitada. Isso levanta a questão se a senescência celular sempre ocorre *in vivo*. Resolver essa questão é complicado pelo fato de que relativamente poucos marcadores bioquímicos são disponíveis, os quais podem ser utilizados para identificar células senescentes dentro de tecidos em que residam grandes populações de células que não estão em crescimento, no estado G_0 . Um marcador de senescência amplamente utilizado é a enzima β -galactosidase ácida, a qual é expressa em células senescentes (veja a Figura 10.3). O uso desse marcador tem fornecido evidências, ainda fragmentadas, de que a senescência celular certamente ocorre *in vivo* (Figura 10.9). Outros marcadores bioquímicos de senescência estão sendo descobertos.

A probabilidade de que a senescência seja um processo fisiológico (mais do que simplesmente um artefato de experimentos em cultura de células) é aumentada por observações que indicam que uma variedade de outros estresses celulares fisiológicos, junto com uma extensa propagação *in vitro*, também é capaz de induzir um estado celular que é indistinguível da senescência replicativa. Dentre estes, estão hiperoxia (estresse oxidativo), dano ao DNA e a sinalização defeituosa por determinadas oncoproteínas. Por exemplo, a elevada sinalização pela proteína Ras pode induzir senescência em certos tipos celulares.

Uma prova definitiva de que a senescência é um fenômeno *in vivo* tem se tornado crítica para o nosso entendimento do desenvolvimento de câncer. Assim, se a senescência celular é verdadeiramente um processo celular fisiológico que ocorre em células dentro de tecidos vivos, podemos

imaginar que ela serve como uma importante barreira ao desenvolvimento de tumores que aparecem espontaneamente. Inversamente, se a senescência celular é, na maior parte, um artefato de cultura de tecidos, seu papel na patogénia do câncer se torna menos plausível.

10.4 A proliferação de células em cultura também é limitada pelos telômeros de seus cromossomos

Enquanto fibroblastos humanos cultivados expressam a oncoproteína “large T” a fim de contornar a senescência (veja a Figura 10.8), eles ainda não estão imortalizados. Após um número adicional de gerações celulares – talvez 10 a 20 – além do tempo em que eles geralmente se tornariam senescentes, as populações celulares entram em crise e exibem apoptose difundida. O antígeno “large T” de SV40, mesmo com sua potente capacidade de inativar p53, claramente não protege contra a morte apoptótica associada a crise.

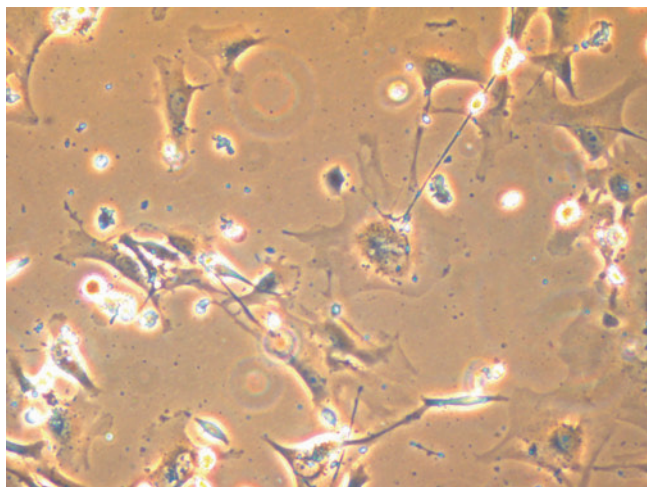
A senescência representa uma parada na proliferação celular com retenção da viabilidade celular sobre extensos períodos, enquanto o processo de crise envolve morte por apoptose (Figura 10.10). As células senescentes parecem ter um cariótipo razoavelmente estável (porém, não totalmente), enquanto células em crise apresentam uma instabilidade cariótica difundida.

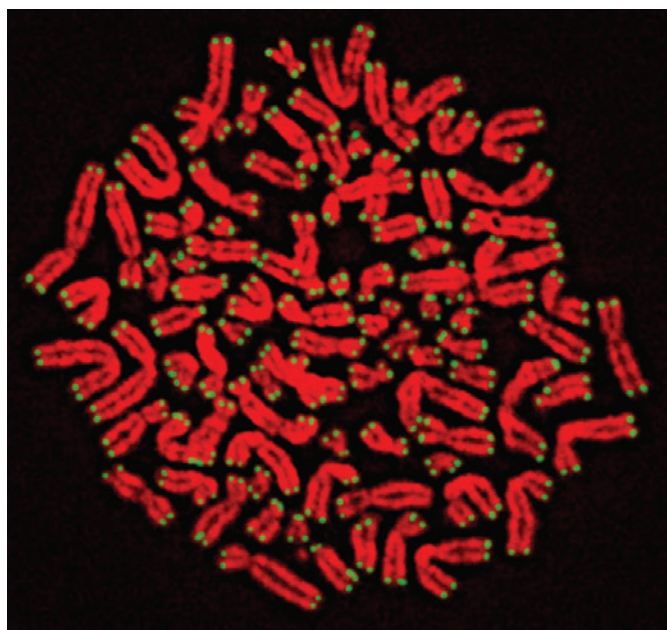
O tempo do processo de crise e o aparecimento de células que entraram nesse estado sugerem o envolvimento de um segundo mecanismo que atua de forma independente do(s) mecanismo(s) que desencadeia(m) a senescência. O funcionamento desse segundo mecanismo tem sido seguido até o DNA cromossomal de células. Diferentemente do(s) mecanismo(s) que leva(m) à senescência, o instrumento molecular que inicia o processo de crise é, na verdade, um dispositivo de contagem funcional que registra quantos ciclos sucessivos de crescimento e divisão as linhagens celulares passaram desde a célula fundadora no embrião jovem.

À primeira vista, o DNA cromossomal pareceria ser um sítio improvável para células mamíferas construir tal “relógio de gerações”. Sabemos que a estrutura do DNA cromossomal é altamente estável e, como consequência, deveria ser imutável de uma geração celular a outra. Um relógio de gerações, em contraste, deve depender de alguma mudança molecular progressiva que é notada e registrada durante cada geração celular. Como moléculas de DNA cromossomal, as quais parecem ser tão imutáveis, podem registrar uma geração celular adicional cada vez que uma célula passa por um ciclo de crescimento e divisão?

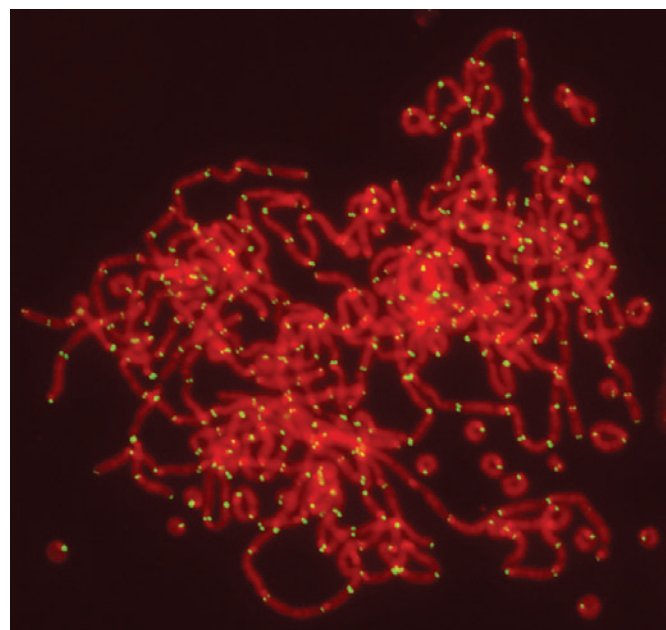
Cada cromossomo de um mamífero carrega uma simples e extremamente longa molécula de DNA. Como demonstrado, as duas extremidades dessa molécula de DNA criam um sério problema para a célula – um problema dramaticamente revelado pela técnica experimental de transfecção de DNA (veja a Seção 4.2). Após entrar nas células, as moléculas de DNA linear transfectadas

Figura 10.10 Apoptose associada a populações celulares em crise. Populações celulares em crise mostram apoptose difundida, com uma alta percentagem de células no meio de desintegração e numerosos fragmentos celulares (*pontos brancos refratários*). Em virtude das populações de células não entrarem em crise simultaneamente, algumas das células em tais populações ainda parecem relativamente normais (*acima, à direita*). (Cortesia de S. A. Stewart.)





(A)



(B)

Figura 10.11 Telômeros detectados por hibridização *in situ* por fluorescência Os telômeros podem ser detectados pela técnica de hibridização *in situ* por fluorescência (FISH), na qual uma sonda de DNA que reconhece as seqüências repetidas presentes no DNA telomérico é acoplada com uma sonda fluorescente. (A) Nesta micrografia, células humanas foram flagradas na metáfase utilizando um antagonista de microtúbulo. Os telômeros dos cromossomos condensados resultantes (vermelho) são, então, visualizados por meio de uma sonda que marca o DNA telomérico (pontos verde-amarelos). Cada cromátide carrega telômeros em ambas as extremidades. Em

virtude de essas células estarem na metáfase, as cromátides pareadas, recentemente replicadas, ainda não se separaram. (B) O cariótipo visto no painel A pode ser comparado com aquele de células que foram privadas de TRF2, uma proteína-chave na manutenção da estrutura normal do telômero (veja a Figura 10.19). Nessas células, os telômeros perdem sua função protetora, resultando em uma massiva fusão de extremidade com extremidade de cromossomos que, freqüentemente, resulta na fusão de todos os cromossomos de uma célula em um enorme cromossomo. (A, cortesia de J. Karlseder e T. de Lange; B, de G. B. Celli e T. de Lange, *Nat. Cell Biol.* 7: 712-718, 2005.)

são rapidamente fusionadas, extremidade com extremidade, por meio de ações de uma variedade de nucleases e DNA ligases que estão ativas na maioria, senão em todos, dos tipos de células mamíferas. Portanto, DNAs lineares são intrinsicamente instáveis em nossas células, ainda que moléculas de DNA linear claramente persistam dentro de cromossomos.

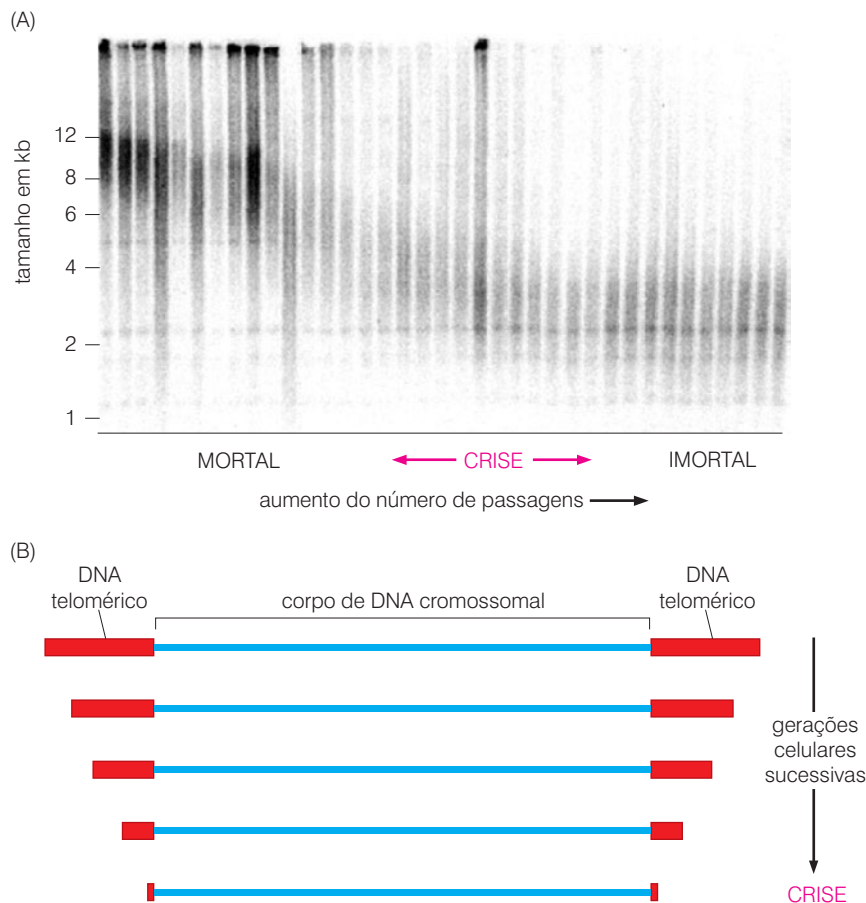
Os **telômeros** localizados nas extremidades dos cromossomos (Figura 10.11) explicam como essas moléculas de DNA linear podem coexistir estavelmente com as diversas enzimas modificadoras de DNA da célula. Os telômeros atuam para prevenir a fusão extremidade-extremidade de moléculas de DNA cromossomal e, portanto, prevenir a fusão de um cromossomo com outro. De fato, os telômeros servem como um escudo protetor para as extremidades cromossomais, assim como as agulhetas que protegem as pontas dos cadarços de sapatos. Como veremos, os eventos catastróficos de crise são disparados quando células perdem os telômeros funcionais de seus cromossomos.

Descobertas relatadas em 1941 por Bárbara McClintock (Figura 10.12) em seus estudos de cromossomos de milho primeiramente revelaram que cromossomos que perderam telômeros funcionais em suas extremidades logo fusionaram, extremidade com extremidade, com outro. Os megacromossomos resultantes possuem dois ou mais **centrômeros**, estruturas cro-



Figura 10.12 Bárbara McClintock Os estudos detalhados de Bárbara McClintock sobre os cromossomos de milho revelaram estruturas especializadas nas extremidades de cromossomos – os telômeros – que os protegem de fusões de extremidade com extremidade. Esse trabalho, e a demonstração de que elementos genéticos móveis no genoma de milho, mais tarde chamados de transposons, a fizeram merecedora do Prêmio Nobel em Fisiologia ou Medicina de 1983. (Cortesia da *American Philosophical Society*.)

Figura 10.13 Encurtamento de DNA telomérico em harmonia com a proliferação celular (A) O tamanho do DNA telomérico foi medido em uma população de linfócitos humanos não-imortalizados. A cada vez que ocorreu uma passagem de cultura, parte foi coletada, e o DNA telomérico dessas células foi analisado. Cada passagem representou de 3 a 6 duplicações de população (PDs). O tamanho deste DNA pode ser medido por meio do tratamento do DNA genômico com diversas enzimas de restrição que não clivam dentro da sequência repetida TTAGGG que constitui o DNA telomérico. Os únicos fragmentos de DNA genômico de alto peso molecular separados são aqueles com a sequência repetida de hexanucleotídeos que constitui o DNA telomérico. O tamanho dos fragmentos de restrição teloméricos (TRFs) resultantes pode ser, então, determinado por meio de eletroforese em gel seguida de análise de *Southern blotting* utilizando uma sonda que reconhece essa sequência. Já que os telômeros dentro de uma dada célula são de tamanhos heterogêneos, e já que a extensão do encurtamento do DNA telomérico difere de uma célula para outra, a distribuição por tamanho de DNA telomérico em cada amostra é completamente heterogênea. Na análise mostrada, os TRFs de linfócitos humanos mortais (ou seja, não-imortalizados) desenvolveram-se cada vez mais curtos com cada passagem sucessiva dessas células (geralmente calculado ser entre 50 e 100 pares de bases por geração celular). Quando os TRFs tornaram-se menores do que 3 kb em tamanho, as células entraram em crise. Mais tarde, quando as células surgiram espontaneamente da crise (e se tornaram imortalizadas), elas mantiveram seu DNA telomérico em tamanhos que eram pouco maiores do que aqueles verificados nessas células em crise. (B) Observações como essas têm levado ao modelo mostrado, no qual o DNA telomérico (vermelho) encurta progressivamente a cada vez que passa por um ciclo de crescimento e divisão até que os telômeros estejam tão desgastados que não possam proteger as extremidades de DNA cromossomal. Esse colapso de telômero provoca a entrada de uma célula no processo de crise. (De fato, não se sabe precisamente como o encurtamento do DNA telomérico, que vem antes da crise, é desencadeado.) Note que esse esboço não apresenta escala: o DNA telomérico tem, geralmente, de 5 a 10 kb em tamanho, enquanto o corpo do DNA cromossomal (azul) tem, freqüentemente, dezenas de megabases em tamanho. (A, de C. M. Counter, F. M. Botelho, P. Wang et al., *J. Virol.* 68: 3410-3414, 1994.)



mossomais especializadas que se ligam às fibras do fuso mitótico durante a mitose. Uma forma extrema dessa fusão é mostrada na Figura 10.11B, na qual, virtualmente, todos os cromossomos de uma célula estão fusionados em um cromossomo gigante.

Como discutido em maior detalhe posteriormente, o DNA componente de cada telômero em nossas células é composto da sequência de hexanucleotídeos 5'-TTAGGG-3', a qual está repetida em *tandem* milhares de vezes; essas sequências repetidas, junto com proteínas associadas, formam o telômero funcional. O DNA telomérico (e, assim, os telômeros) de células humanas normais proliferam em cultura de uma forma progressivamente encurtada durante cada ciclo de crescimento e divisão, até se tornarem tão curtos que não possam proteger efetivamente, não por muito tempo, as extremidades de cromossomos (Figura 10.13). Nesse ponto, ocorre a crise, a fusão de cromossomos, e observa-se uma morte apoptótica difundida. Portanto, em tais células, é o encurtamento do telômero que atua para registrar o número de gerações celulares através das quais as populações celulares passam desde sua origem no embrião jovem.

Em células humanas que entram em crise, os eventos iniciais de fusão de extremidade com extremidade geralmente ocorrem entre as extremidades teloméricas desgastadas de duas cromátides irmãs que formam as duas metades do mesmo cromossomo (Figura 10.14A). Lembre que cromátides pareadas existem durante a fase G₂ do ciclo celular – um período após a fase S, que cria duas cromátides a partir de um cromossomo parental – e antes da fase M, quando essas duas cromátides irmãs são destinadas à separação (veja a Figura 8.3). Tais fusões entre as extremidades de cromátides irmãs (preferivelmente do que entre as extremidades de dois cromossomos não-relacionados) são favorecidas por no mínimo duas razões. Primeiro, as duas cromátides, e suas extremidades, são presas com grande proximidade por meio de seus centrômeros unidos. Segundo, por razões desconhecidas, os telômeros encurtam a velo-

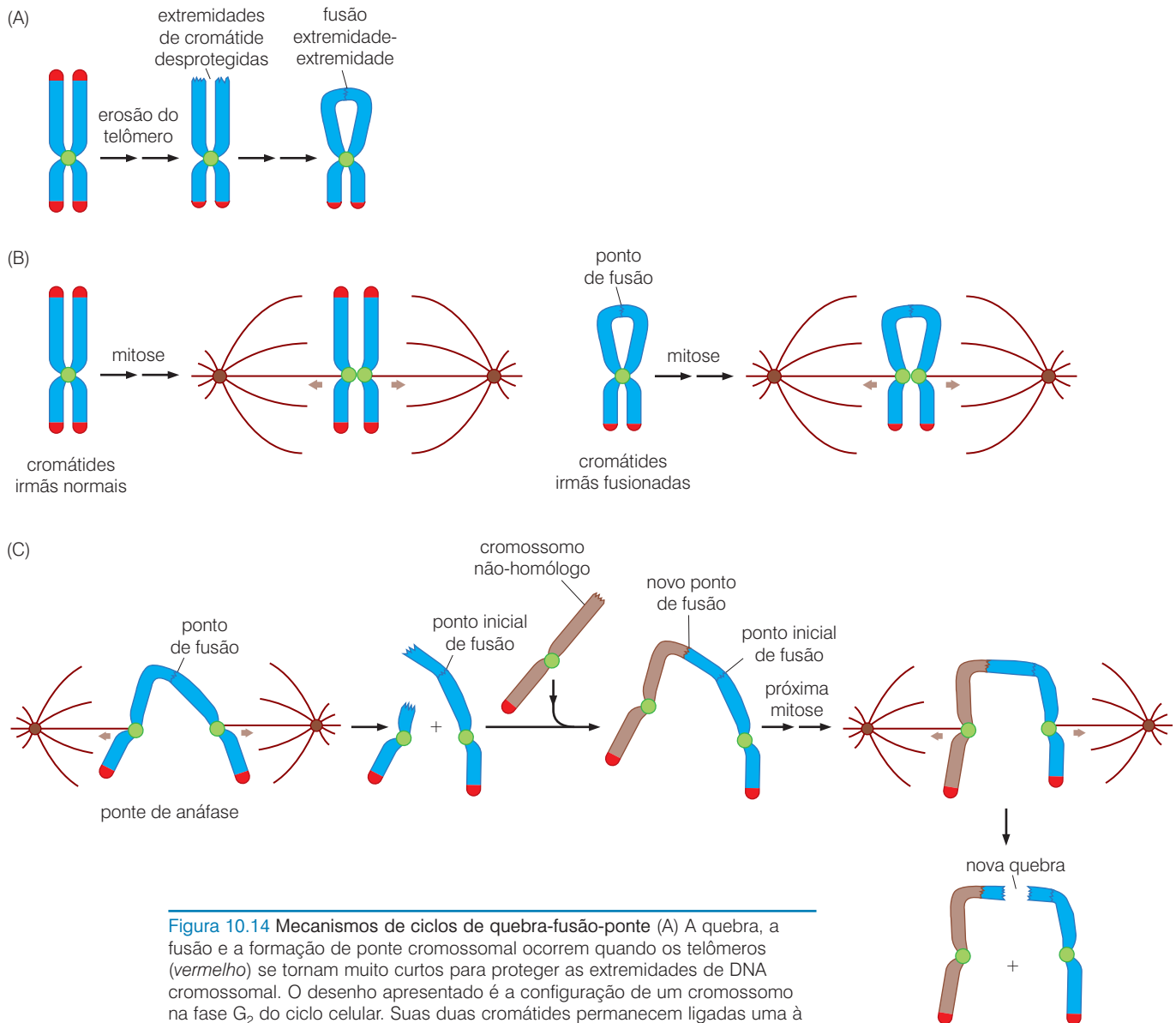


Figura 10.14 Mecanismos de ciclos de quebra-fusão-ponte (A) A quebra, a fusão e a formação de ponte cromossomal ocorrem quando os telômeros (vermelho) se tornam muito curtos para proteger as extremidades de DNA cromossomal. O desenho apresentado é a configuração de um cromossomo na fase G_2 do ciclo celular. Suas duas cromátides permanecem ligadas uma à outra por seu centrômero compartilhado (verde). Como mostrado, os telômeros dos braços longos desse cromossomo azul foram desgastados antes daqueles dos braços curtos. Ambas as extremidades dos braços longos estão igualmente desgastadas, já que recentemente foram duplicadas durante a fase S prévia. As extremidades desses dois braços, mantidos em uma grande proximidade pelo centrômero compartilhado, agora se fusionam um com o outro, levando a uma cromátide dicêntrica, que contém dois telômeros e dois centrômeros. (B) Durante uma mitose normal, as duas cromátides irmãs serão tracionadas separadamente dos centrossomos opostos localizados nas duas extremidades polares do fuso mitótico (esquerda). Do mesmo modo, o fuso mitótico tracionará os centrômeros (verde) de um cromossomo dicêntrico em direções opostas, sem ter consciência de que essas duas cromátides são unidas por seus braços longos. (C) Diferentemente de pares de cromátides configurados normalmente, os quais se separarão e segregarão em grupos, próximo aos dois centrômeros, o cromossomo dicêntrico não será capaz do mesmo; em vez disso, criará uma ponte entre os dois pólos do fuso mitótico durante a anáfase da mitose. Finalmente, o cromossomo dicêntrico será rasgado em algum ponto fraco. Durante o próximo ciclo celular, o fragmento maior sem um telômero em uma extremidade (azul) poderá fusionar com outro cromossomo atelomérico (bege), criando um novo cromossomo dicêntrico, o qual será tracionado durante uma mitose subsequente, resultando, mais uma vez, em um ciclo de quebra-fusão-ponte. (O destino do fragmento mais curto de cromátide gerado pelo primeiro ciclo de quebra não é mostrado.)

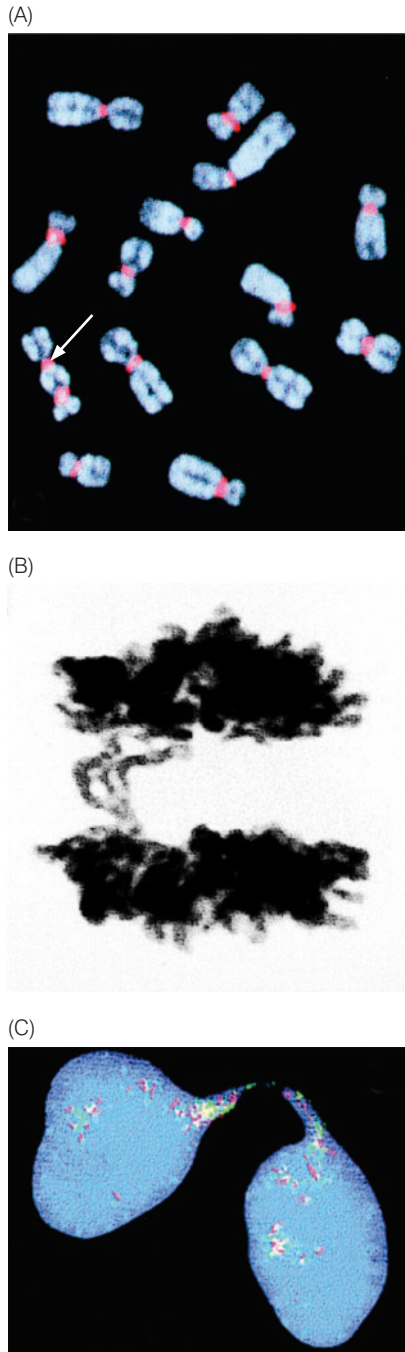


Figura 10.15 Cromossomos dicêntricos, pontes de anáfase e pontes internucleares (A) Um cromossomo dicêntrico é visto (*seta branca*) em uma anáfase de células de uma linhagem de carcinoma pancreático humano. Os centrômeros foram corados (rosa). (B) Tais cromossomos dicêntricos freqüentemente resultam na formação de pontes de anáfase, diversas das quais são verificadas em uma célula de histiocitoma fibroso maligno humano. Os dois grupos opostos de cromossomos são incapazes de se separar apropriadamente um do outro, pois eles ainda estão conectados por múltiplas pontes de anáfase. A observação de tais pontes de anáfase (veja a Figura 10.14) fornece fortes evidências de que cromossomos dentro de tais células participam de ciclos de quebra-fusão-ponte, pois eles não possuem telômeros adequadamente longos. (C) Enquanto a maioria das pontes de anáfase é rompida durante a telófase ou citocinese, algumas podem persistir nas células de intérfase resultantes, causando, por exemplo, a ligação dos núcleos de duas células-filhas de uma célula tumoral linfomática humana por uma ponte de cromatina. (De D. Gisselsson, L. Pettersson, M. Hoglund et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 5357-53662, 2000.)

idades diferentes nos diferentes braços cromossômicos. Conseqüentemente, os dois DNAs teloméricos homólogos (p. ex., o par de telômeros nas extremidades dos braços longos das cromátides do Cromossomo 9 humano), tendo sido gerados somente por replicação de DNA, possuem estruturas moleculares virtualmente idênticas. Assim, se a extremidade telomérica de uma cromátide tornou-se encurtada, desgastada e vulnerável à fusão, é provável que sua contraparte na outra cromátide pareada esteja no mesmo estado.

Quando essas cromátides fusionadas participam na mitose que se segue, seus dois centrômeros serão puxados em direções opostas pelo fuso mitótico, criando as dramáticas *pontes de anáfase* que são freqüentemente visualizadas seguindo a extensa erosão telomérica (Figura 10.14B). Mais cedo ou mais tarde, o aparato mitótico que é puxado em tal cromátide **dicêntrica** (uma cromátide com dois centrômeros) realizará seu resgate em algum sítio aleatório entre os dois centrômeros (Figura 10.14C). Isso resulta em duas novas extremidades cromossômicas, nenhuma das quais possui um telômero. Tais extremidades desprotegidas podem fusionar uma com a outra ou com extremidades desprotegidas de outros cromossomos não-homólogos.

No momento em que a extremidade não-telomérica defeituosa resultante de um cromossomo fusiona com a extremidade de um outro cromossomo (não-homólogo), o destino dessa nova cromátide dicêntrica resultante é mais ambíguo (veja a Figura 10.14C). Na metade das vezes, em média, os dois centrômeros serão puxados na mesma direção ao centrôssomo, que gera núcleo em uma das duas células-filhas que estão prontas a nascer, e nenhuma quebra ocorrerá. Na outra metade do tempo, os dois centrômeros de uma cromátide dicêntrica se ligarão aos dois corpos opostos do fuso e aos dois centrôssomos localizados em lados opostos da célula mitótica. Quando cromátides são separadas durante a anáfase na mitose, essa segunda configuração (como a primeira entre cromátides irmãs) provará mais uma vez ser desastrosa, já que envolverá a destruição de parte de uma cromátide e a geração de extremidades que estão, como antes, desprotegidas pelos telômeros.

Essas novas extremidades cromossômicas geradas mais uma vez tentarão fusionar com outros cromossomos, resultando em mais cromossomos dicêntricos e em um novo ciclo de quebra cromossomal. Essa seqüência de eventos é chamada *ciclo de quebra-fusão-ponte* (BFB), já que envolve a *quebra* inicial de cromátides dicêntricas na anáfase, a subsequente *fusão* das extremidades de DNA não-telomérico resultante com outras cromátides e a formação, novamente, de *pontes* de anáfase pelos novos cromossomos dicêntricos resultantes dessas fusões (Figura 10.15). Enquanto estão ocorrendo, esses ciclos de BFB criam um caos cariotípico que tem o potencial para afetar muitos cromossomos dentro de uma célula, como proposto em 1941 por McClintock.

A relevância de telômeros para o estado de crise é indicada pelo fato de que as células que entram em crise mostram precisamente o tipo de desordem cariotípica que é observada quando cromossomos perdem seus telômeros. Além disso, os cromossomos que estão fusionando dentro dessas células possuem especialmente telômeros curtos, ou nenhum. Essas observações bastante diferentes fornecem claras indicações de que a maquinaria molecular que desencadeia a crise reside nos telômeros.

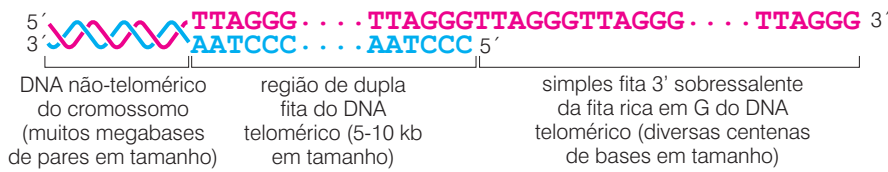


Figura 10.16 A extremidade 3' sobressalente do DNA telomérico. A fita rica em G do DNA telomérico (rosa) estende-se além da fita rica em C (azul). Isso cria uma fita 3' sobressalente (*direita*) que possui, frequentemente, diversas centenas de nucleotídeos em tamanho. Essa fita sobressalente é muito mais curta do que a porção dupla-fita do DNA telomérico (*esquerda*), a qual possui em torno de 5 a 10 kb em tamanho e que não é apresentada aqui em escala.

10.5 Os telômeros são estruturas moleculares complexas que não são replicadas facilmente

A pesquisa conduzida desde a metade dos anos 1980 tem revelado a estrutura molecular de telômeros e seu DNA. Para começar, e como citado anteriormente, o DNA telomérico de células mamíferas (tanto quanto as células de muitos outros metazoários) é formado a partir da sequência repetida de hexanucleotídeos 5'-TTAGGG-3' em uma fita (a fita “rica em G”) e a complementar 5'-CCCTAA-3' na outra (a fita “rica em C”). Em células humanas normais, o DNA telomérico é formado a partir de milhares dessas sequências de hexanucleotídeos, resultando em longos trechos de 5 a 10 pares de quilobases de tais sequências repetidas nas extremidades de todos os cromossomos.

O DNA telomérico de células mamíferas, e possivelmente as células de todos os eucariotos, possui um aspecto adicional, diferente: sua fita rica em G é mais longa de cem a diversas centenas de nucleotídeos, resultando em um longo apêndice de fita simples 3' (Figura 10.16). Essa fita sobressalente com frequência é encontrada em uma configuração molecular mais incomum chamada de **alça T**. Esta foi descoberta no final dos anos 1990, quando o DNA telomérico analisado no microscópio eletrônico foi encontrado em uma configuração curvada, com efeito de um laço (Figura 10.17A). Tem-se interpretado que essa estrutura depende da formação de um complexo de três fitas de DNA (Figura 10.17B e C). A alça T pode estar presente nas extremidades de todos os telômeros, embora tenha sido observada em um único subconjunto daqueles verificados, provavelmente por causa das dificuldades técnicas associadas à preservação e à visualização dessa estrutura no microscópio eletrônico. A alça T pode auxiliar na proteção das extremidades de moléculas de DNA linear, pois a extremidade da região sobressalente fita simples é dobrada em uma região dupla-fita, fora do caminho do dano.

Ambos, o relativamente longo DNA telomérico dupla-fita e a curta extremidade sobressalente, são ligados por proteínas específicas. Como se pode esperar, algumas das proteínas possuem domínios que reconhecem especificamente e se ligam à sequência de hexanucleotídeos presentes nas regiões de dupla-fita e fita simples do DNA telomérico (Figura 10.18). Juntos,

Figura 10.17 Estrutura da alça T. (A) A purificação de DNA telomérico a partir de células de camundongo (seguida da estabilização de estruturas dupla-fita por meio de ligação cruzada de compostos) revela, em microscopia eletrônica, laços nas extremidades do DNA cromossomal, os quais têm sido chamados *alças T*. (B) Um desenho esquemático da alça T indica que a extremidade 3' sobressalente da fita rica em G (rosa) está anelada a uma pequena região da fita rica em C (azul), causando a formação de um laço deslocado (*fita rosa*). As polaridades 5' a 3' das duas fitas são indicadas por pontas de flecha. (C) A alça T é ilustrada mais uma vez, dessa vez com as duplas hélices desenhadas e a extremidade 3' sobressalente enfatizada em uma linha mais larga (rosa). (A, de J. D. Griffith, L. Comeau, S. Rosenfield et al., *Cell* 97: 503-514, 1999.)

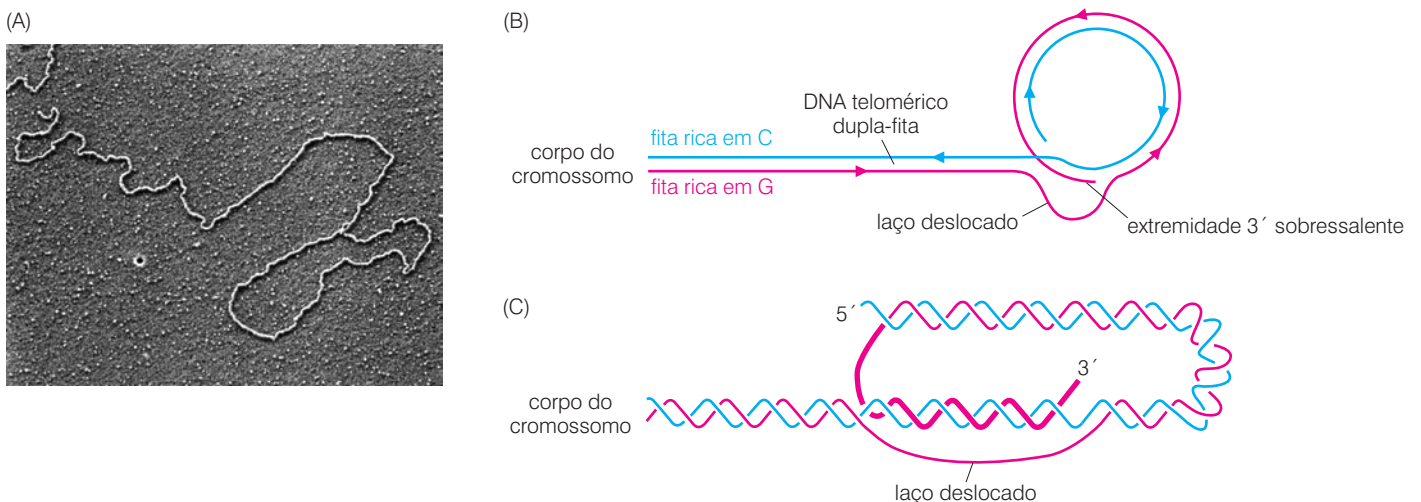
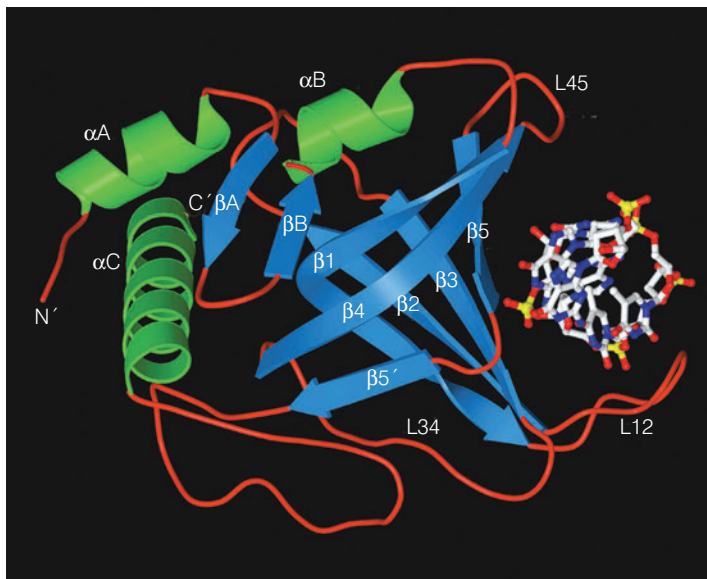


Figura 10.18 Estrutura de uma proteína associada a telômero. Em adição à sua complexa estrutura (Figura 10.17), o DNA telomérico é protegido da degradação por várias proteínas associadas ligadoras de telômero. Esta é a estrutura de uma delas, chamada Pot1, mostrada como um diagrama de fitas com suas hélices α , fitas β pregueadas e laços numerados. Pot1 liga tanto o DNA telomérico fita simples como o de dupla-fita de maneira que auxilie na estabilização de sua estrutura. À direita podemos verificar uma pequena figura do DNA telomérico de fita simples que é ligado por Pot1. (Cortesia de M. Lei.)

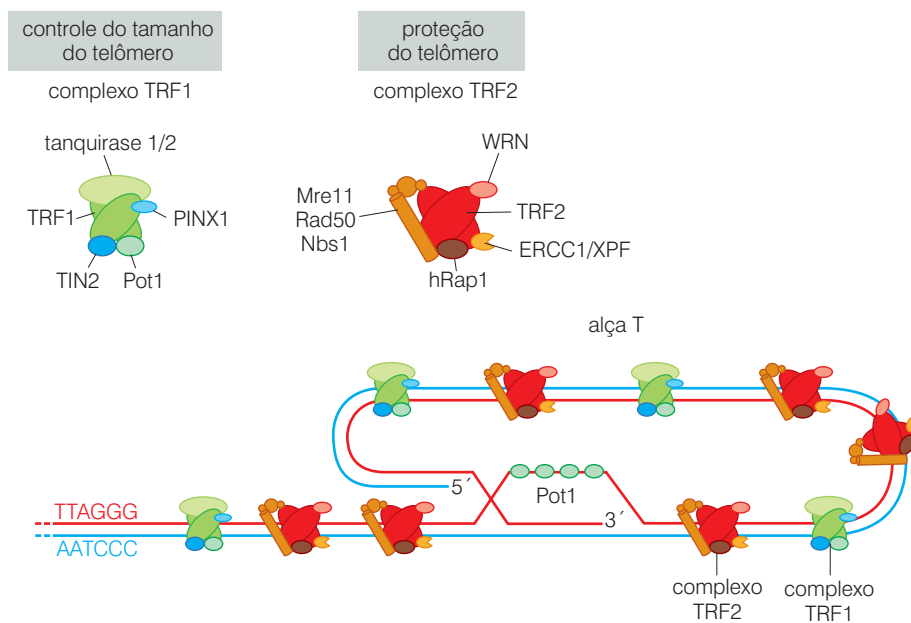


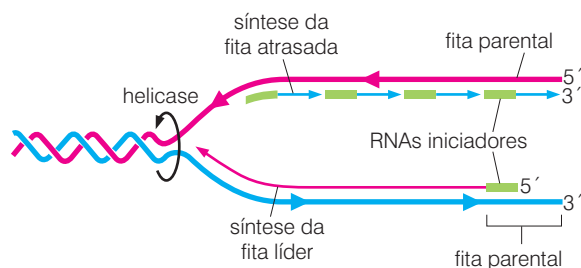
essas proteínas ligadoras de telômero e o DNA telomérico formam os complexos nucleoproteína que chamamos telômeros (Figura 10.19).

Enquanto a maquinaria de replicação, que opera durante a fase S do ciclo celular, é altamente efetiva em copiar as seqüências do meio de moléculas de DNA linear, tais como aquelas do corpo de cada um de nossos cromossomos, essa maquinaria possui uma grande dificuldade em copiar seqüências das várias extremidades dessas moléculas. A dificuldade pode ser rastreada ao requerimento de que a síntese de todas as fitas durante a replicação de DNA deve ser iniciada na extremidade 3'-hidroxil de uma fita de DNA existente, a qual serve como um **iniciador** para a elongação da fita de DNA; alternativamente, na ausência de um iniciador de DNA disponível, a extremidade 3' de uma molécula de RNA pode servir como um iniciador para a síntese de DNA (Figura 10.20).

Se a enzima **primase**, a qual é responsável pela instalação de curtos iniciadores de RNA, deposita um iniciador com alguma distância da extremidade 3' de uma fita molde na qual a “síntese da fita

Figura 10.19 Múltiplas proteínas telômero-específicas ligam-se ao DNA telomérico. Pot1 (Figura 10.18) é somente uma de um grande arranjo de proteínas de ligação telômero-específicas que foram descobertas. Suas contribuições precisas à estabilização do telômero ainda precisam ser elucidadas. No mínimo dois complexos distintos de proteínas foram encontrados, ambos os quais se ligam à porção dupla-fita do DNA telomérico. Provocativamente, os complexos contendo TRF2 apresentam várias proteínas que participam do reparo de dano genômico, algumas das quais estão descritas no Capítulo 12. Pot1 também pode se ligar ao laço da fita simples rica em G que é deslocado pela formação da alça T (abaixo, no centro). (De T. de Lange, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5: 323-329, 2004.)





principal” está ocorrendo (veja a Figura 10.20), uma DNA polimerase iniciará a síntese de uma nova fita de DNA que não possui um número substancial das bases complementares às várias extremidades 3’ dessa fita molde. (Mesmo se a primase “se acoplar” e construir um iniciador de RNA nas várias extremidades da fita molde, as sequências correspondentes aos aproximados 10 nucleotídeos do iniciador de RNA não estarão presentes na nova fita filha sintetizada, já que o iniciador de RNA será degradado após ter servido ao seu propósito de iniciar a elongação da fita de DNA.)

Esse *problema de replicação de extremidade* fornece uma explicação molecular para o encurtamento do DNA telomérico observado a cada vez que uma célula humana normal passa por um ciclo celular. Em adição à sub-replicação de extremidades de DNA telomérico, parecem existir exonucleases dentro das células que mastigam vagarosamente as extremidades de DNA telomérico e podem finalmente contribuir para a erosão do telômero. Seja qual for a razão, em muitos tipos de células humanas normais, os telômeros perdem 50 a 100 pares de bases de DNA durante cada geração celular (veja a Figura 10.13). Esse desgaste progressivo de DNA telomérico representa um dispositivo molecular simples que limita quantas gerações de progênie descendente uma célula pode gerar.

Podemos imaginar, por exemplo, que em células embrionárias humanas, o DNA telomérico inicia mais longo, talvez 8 a 10 kb em tamanho. Como diversas linhagens de células descendentes por todo o corpo desenvolvido prosseguem através de seus repetidos ciclos de crescimento e divisão, os telômeros nessas células crescem progressivamente mais curtos. Finalmente, em algumas células, o DNA telomérico desgasta a um tamanho que é tão curto que não pode realizar por muito tempo sua função de proteger as extremidades do DNA cromossomal, tendo como resultado os ciclos de quebra-fusão-ponte e translocações cromossomais que são ilustradas na Figura 10.14. Realmente, é plausível que o envelhecimento de certos tecidos derive da perda de potencial replicativo por células individuais, e que essa perda pode ser atribuída, por sua vez, ao desgaste do telômero. Entretanto, ainda não descobrimos como usar o tamanho do telômero para prever o início de ciclos BFB e de crise (Barra lateral 10.3).

Enquanto as evidências ainda são indiretas, é altamente provável que o encurtamento do telômero, por meio da limitação do potencial replicativo de linhagens celulares, crie um obstáculo para o acúmulo de grandes populações de células cancerosas. Assim, como discutido anteriormente, caso um clone de células adquira mutações oncogênicas (envolvendo a ativação de oncogene e inativação de gene supressor de tumor), a capacidade desse clone em expandir para um tamanho clinicamente detectável é provavelmente reprimida por seus telômeros desgastados.

Figura 10.20 Iniciadores e a iniciação da síntese de DNA Durante a replicação do DNA, o DNA parental de dupla hélice (esquerda) é aberto por uma enzima helicase, permitindo que o processo de replicação, como um todo, progrida em direção à esquerda. A síntese da nova “fita atrasada” (acima) é possivelmente realizada por meio da presença de curtos segmentos iniciadores de RNA (*retângulos verdes*) que são colocados em intervalos de diversas centenas de nucleotídeos pela enzima primase. As extremidades 3’ hidroxil dessas moléculas de RNA servem como sítios de iniciação de novas fitas filhas (*azul-claro*). Em virtude dessa síntese (como todas as sínteses de DNA) ocorrer da direção 5’ para 3’, esses segmentos de fita atrasados crescem em uma direção oposta à direção do avanço da forquilha de replicação. A cópia da outra fita parental (*abaixo*), a qual também é iniciada por um RNA iniciador (*verde*), pode ser realizada continuamente, sendo que essa fita principal pode crescer até a extremidade 3’, já que o DNA parental está aberto. Entretanto, o RNA iniciador que é responsável pela iniciação da síntese da “fita líder” pode estar em um local a muitos nucleotídeos (para a esquerda) da extremidade 3’ da fita parental azul; em adição, o próprio RNA iniciador será perdido quando ele for subsequente degradado durante a maturação do DNA recentemente sintetizado. Por essas razões, a síntese da fita líder levará à sub-replicação de uma das fitas parentais (*azul*) de DNA (*abaixo, à direita*).

Barra lateral 10.3 Medidas de tamanho do DNA telomérico não fornecem uma predição exata do potencial replicativo futuro Mesmo se a média de tamanho do DNA telomérico em uma célula é conhecida, o número de gerações replicativas que seus descendentes podem passar antes do começo da crise não pode ser predito com qualquer exatidão. Como indicado anteriormente, alguns telômeros dentro de uma célula encurtam mais rapidamente do que outros. Conseqüentemente, o tamanho dos telômeros mais curtos de uma célula pode determinar o

potencial replicativo de sua progênie, já que esses telômeros determinarão o momento dos primeiros ciclos de quebra-fusão-ponte e, assim, o início da crise. Além disso, não sabemos realmente o quão curto um DNA telomérico deve se tornar para que ele comece a perder suas funções protetoras. Em alguns casos, é como se o DNA telomérico que ainda possui diversos kb em tamanho já tivesse perdido sua capacidade de prevenir as fusões extremidade com extremidade de DNA cromossomal.

10.6 Células cancerosas incipientes podem escapar da crise por meio da expressão de telomerase

O comportamento detalhado de clones de células pré-neoplásicas *in vivo* é difícil de estudar, e, assim, somos forçados a extrapolar a partir de observações de cultura de células, como fibroblastos humanos. Como mencionado anteriormente, se é permitido que essas células evitem a senescência por meio da expressão da oncoproteína “large T” de SV40, elas continuarão a replicar outras 10 a 20 gerações celulares e, então, entrarão em crise. Em uma ocasião rara, um pequeno grupo de células emergirá espontaneamente da vasta aglomeração de células no meio da crise. Esses clones celulares diferentes – talvez originados de uma única célula dentre 10 milhões de células em crise – prosseguirão com a proliferação e continuarão a fazê-la de maneira indefinida (p. ex., veja a Figura 10.13A). Eles se tornaram imortalizados, aparentemente como consequência de algum evento aleatório.

Essa transição, observada com células cultivadas *in vitro*, parece recapitular o comportamento de populações celulares pré-malignas *in vivo*. Assim, ambas as populações celulares entram em crise mais cedo ou mais tarde, tendo passado por um grande número de gerações replicativas e sofrido extenso desgaste de seus telômeros, sendo que ambas são capazes de gerar raros variantes imortais que têm aparentemente resolvido o problema de colapso do telômero.

Como essas populações celulares em crise podem tratar e resolver o problema de colapso do telômero? À primeira vista, a crise e o colapso do telômero pareciam ser processos irreversíveis dos quais as células não poderiam escapar. À medida que vai se revelando, a rota para a imortalidade é simples e, em retrospecto, óbvia: as células podem emergir da crise por meio da regeneração de seus telômeros, apagando, desse modo, a anotação molecular (seus telômeros encurtados) que previamente bloqueou sua proliferação e as direcionou para a crise.

A regeneração do telômero pode ser acompanhada por meio das ações da enzima **telomerase**, a qual atua especialmente para alongar o DNA telomérico. Uma extraordinária descoberta é que a atividade da telomerase é claramente detectável em 85 a 90% das amostras de células humanas tumorais, enquanto é encontrada em níveis muito baixos nos lisados da maioria dos tipos de células humanas normais, como quantificado por meio do ensaio TRAP (Figura 10.21). Esses baixos níveis de atividade de telomerase, enquanto podem possibilitar algum tipo de manutenção mínima das extremidades de DNA telomérico (veja a Barra lateral 10.4), são claramente incapazes de prevenir o desgaste progressivo do telômero que acompanha a passagem de células humanas normais através de cada ciclo celular.

Em humanos adultos, existem, na verdade, diversas exceções conhecidas para os baixos níveis de atividade de telomerase geralmente observados em células normais. Por exemplo, uma atividade enzimática substancial está presente nas células germinativas dos testículos, e linfócitos expressam uma explosão de atividade de telomerase quando se tornam funcionalmente ativados.

A evidência disponível indica que uma forte expressão da enzima telomerase está presente no início da embriogênese e é grandemente perdida durante a diferenciação celular que produz a grande maioria dos tecidos do corpo. Assim, durante o curso do início da embriogênese de camundongos e vacas, a telomerase é muito expressa em células embrionárias no período entre os estágios de blastocisto e mórula e parece desaparecer depois disso; é provável que um controle similar da expressão da telomerase opere durante o desenvolvimento embrionário humano. Conseqüentemente, a grande maioria das células somáticas humanas normais, enquanto carregam o complemento completo de genes que especificam a enzima telomerase, estão isentas dos serviços dessa enzima, pois elas não *expressam* esse(s) gene(s) em níveis significativos.

Dentre as grandes populações de células cultivadas em crise, entretanto, variantes raras encontram uma maneira para desreprimir o gene, ou genes, que codifica a telomerase e, dessa forma, adquirem altos níveis de enzima constitutivamente expressa. Isso possibilita que elas estendam seu DNA telomérico a um tamanho que permita proliferação adicional. Certa-

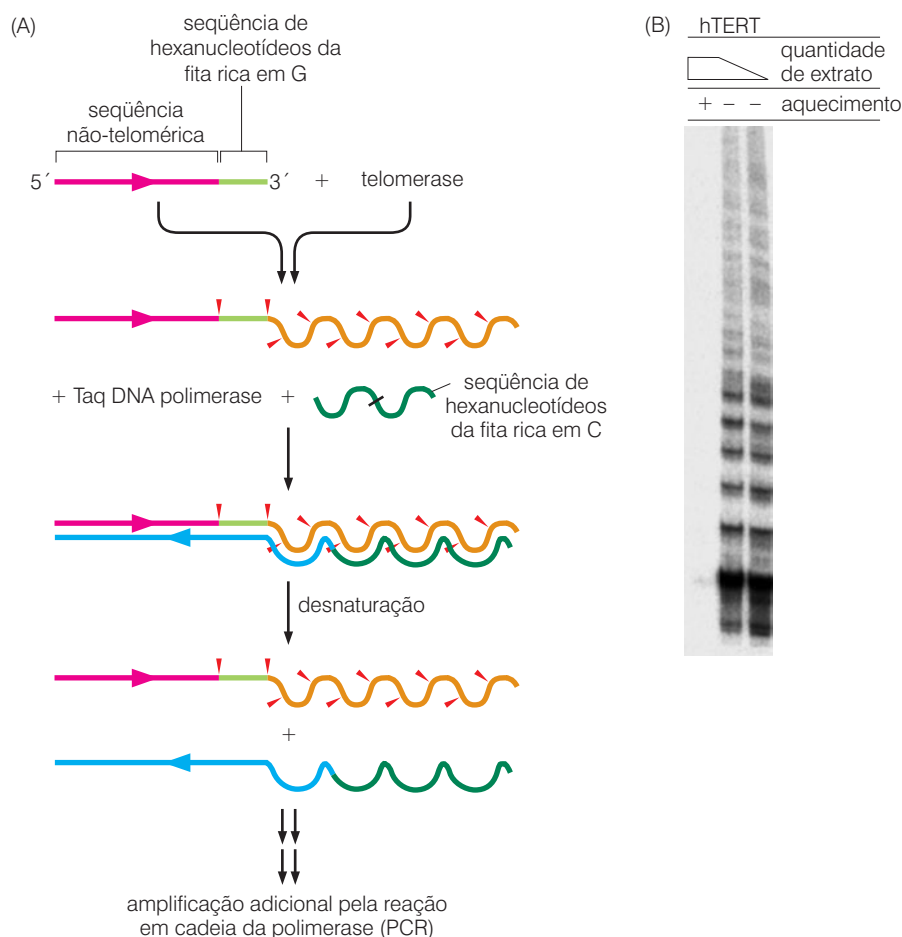


Figura 10.21 O ensaio TRAP (A) O ensaio do protocolo de amplificação repetida do telômero (TRAP) permite a detecção de pequenos níveis de atividade de telomerase em lisados celulares por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificar os produtos da enzima telomerase. Um iniciador consistindo em seqüências não-teloméricas (rosa) e seqüências teloméricas de hexanucleotídeos (da fita rica em G; verde-claro) é adicionado a um lisado celular na presença de deoxirribonucleotídeos trifosfatos. Esse iniciador é estendido (laranja-claro) por qualquer telomerase que possa estar presente em um lisado celular. A enzima termoestável Taq polimerase é, então, adicionada com um iniciador da fita rica em C (verde-escuro), e a segunda fita é alongada (azul-claro). Essas duas fitas de DNA são então desnaturadas e copiadas repetidamente por PCR na presença de iniciadores apropriados. (B) Os produtos da reação TRAP são analisados por meio de eletroforese em gel para resolver as moléculas de DNA que diferem em tamanho pelos hexanucleotídeos adicionados. Como um controle negativo, um breve aquecimento de uma porção do lisado é utilizado no início da reação para desnaturar e inativar qualquer telomerase que possa estar presente (primeira canaleta); isso é realizado para determinar se qualquer DNA polimerase resistente ao calor está presente no lisado em adição à própria telomerase. Neste experimento, células em pré-crise foram infectadas com um vetor de expressão que especifica hTERT, a subunidade catalítica da holoenzima telomerase, induzindo, desse modo, altos níveis de atividade de telomerase que são prontamente detectados quando altos (segunda canaleta) e baixos (terceira canaleta) níveis de extrato celular são testados. (De M. Meyerson, C. M. Counter, E. N. Eaton et al., *Cell* 90: 785-795, 1997.)

mente, tanto quanto seus descendentes que continuam a expressar a telomerase, tais células continuarão a proliferar e, assim, serão consideradas imortais. Presume-se que uma seqüência similar de eventos ocorra *in vivo* quando populações de células pré-neoplásicas entram em crise e, em rara ocasião, geram variantes imortais que se tornam os progenitores de grandes populações de células neoplásicas.

A enzima telomerase foi inicialmente caracterizada em fermento de padeiro utilizando-se análises genéticas e em ciliados por meio de purificação bioquímica. Ela é uma enzima complexa composta de várias subunidades diferentes, nem todas as quais foram caracterizadas. No núcleo da holoenzima telomerase mamífera, estão duas subunidades. Uma subunidade é uma DNA polimerase, mais especificamente uma transcriptase reversa, que funciona, como as enzimas produzidas por retrovírus (Seção 3.7) e uma variedade de outros vírus e elementos de transposição, para sintetizar DNA a partir de um RNA molde (Figura 10.22). Entretanto, ao contrário dessas outras transcriptases reversas, a holoenzima telomerase claramente empa-

las avançam para a fase G₂ de seus ciclos celulares. Essa pequena quantidade de atividade enzimática pode ser suficiente para reparar ou regenerar as alças T nas extremidades dos telômeros (Figura 10.17), porém claramente é pouca para manter ou estender o tamanho do DNA telomérico, o qual é grandemente determinado por sua região dupla-fita. Uma questão ainda não respondida por esses experimentos é se as células-tronco de determinados tecidos normais expressam níveis significativos de atividade de telomerase enquanto sua progênie mais diferenciada não.

Barra lateral 10.4 A telomerase é, na verdade, expressa em células humanas normais, embora em baixos níveis. Pensava-se que a grande maioria das células cancerosas humanas expressasse altos níveis da enzima telomerase, enquanto células normais não expressavam nada (veja a Figura 10.21B). De fato, o uso de anticorpo monoclonal para imunoprecipitar a enzima telomerase antes da análise de TRAP revelou que em células humanas normais, uma pequena quantidade de atividade enzimática é detectada transitoriamente quando as células entram na fase S e desaparece quando as células

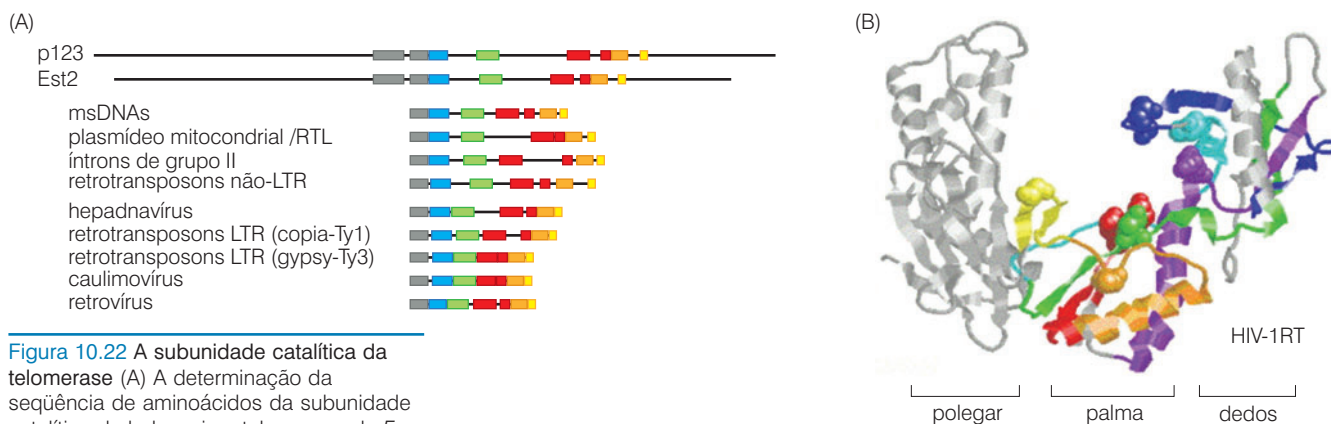


Figura 10.22 A subunidade catalítica da telomerase (A) A determinação da sequência de aminoácidos da subunidade catalítica da holoenzima telomerase de *E. aedicularis* permitiu a clonagem do gene codificante, chamado inicialmente de p123. Esse gene é homólogo à subunidade catalítica da holoenzima telomerase de *Saccharomyces cerevisiae* (levedura), chamada Est2 (do inglês, *ever-shorter telomeres*). A análise detalhada da sequência revelou uma extensa relação de sequência dessas duas subunidades catalíticas às fendas catalíticas de transcriptases reversas (TRs) especificadas por uma variedade tanto de retrotransposons como de vírus, incluindo retrovírus, como o vírus da imunodeficiência humana. (B) As regiões de homologia são mapeadas na estrutura tridimensional da transcriptase reversa do vírus da imunodeficiência humana (HIV-1 TR). (De T. M. Nakamura, G. B. Morin, K. B. Chapman et al., *Science* 277: 955-959, 1997.)

cota seu próprio RNA molde – a segunda subunidade essencial. Um curto segmento dessa molécula de RNA de 451 nucleotídeos em tamanho serve como o molde que instrui a atividade de transcriptase reversa da holoenzima.

O isolamento de quantidades substanciais da proteína telomerase a partir do ciliado *Euplotes aedicularis* permitiu a determinação da sequência de aminoácidos de sua subunidade catalítica e, então, a clonagem do gene que codifica a enzima de ciliado tanto quanto o gene humano homólogo. Em células humanas, essa subunidade catalítica, chamada hTERT (do inglês *human telomerase reverse transcriptase*), sintetiza uma molécula de DNA que é complementar aos seis nucleotídeos presentes na molécula de RNA associada à telomerase (hTR; seu gene codificante é algumas vezes chamado *TERC*), ligando esses nucleotídeos à extremidade sobressalente 3' rica em G do DNA telomérico preexistente (Figura 10.23). A fita complementar do DNA telomérico é, então, presumivelmente sintetizada por DNA polimerases convencionais.

Como seria predito a partir do cenário descrito anteriormente, antes de entrarem em crise, as células humanas são essencialmente telomerase-negativas e não expressam níveis apreciáveis do mRNA de *hTERT*. Entretanto, se uma variante rara imortalizada surge a partir de uma população de células em crise, seus descendentes geralmente expressam níveis significativos de mRNA de *hTERT* e exibem níveis substanciais de atividade da enzima telomerase (Figura 10.24). Essa observação demonstra diretamente que a desrepressão da expressão do gene *hTERT* acompanha o escape dessas células da crise.

A súbita aquisição de atividade de telomerase pode ser somente uma *combinação* do escape da crise, em vez de uma *causa*. Essa ambigüidade pode ser resolvida por meio de um simples experimento: uma versão de cDNA do gene *hTERT* pode ser introduzida em células antes de estas serem destinadas à crise. O cDNA de *hTERT* introduzido confere atividade de telomerase nessas células, causando o alongamento de seus telômeros bastante encurtados, prevenindo a entrada em crise e possibilitando que tais células cresçam indefinidamente (Figura 10.25).

O resultado desse experimento e outros semelhantes provam, na verdade, três pontos relacionados. Primeiro, enquanto a holoenzima telomerase pode ser composta de múltiplas subunidades distintas, a única subunidade ausente em células humanas normais em pré-crise é a subunidade catalítica codificada pelo gene *hTERT*; as demais subunidades da holoenzima telomerase, incluindo a molécula de RNA *hTR* associada à telomerase, parecem estar presentes em quantidades adequadas em células em pré-crise. Segundo, em virtude da expressão de telomerase (em vez de outra enzima) permitir que as células evitem a crise, e que a telomerase atue especificamente em DNA telomérico, essas observações demonstram que uma causa de crise, sem dúvida, devem ser os telômeros bastante encurtados. Terceiro, esse experimento mostra que a aquisição da atividade de telomerase, a qual pode ser alcançada espontaneamente por variantes celulares raras entre uma população de células em crise, é suficiente para capacitar essas células a escaparem da crise e gerarem descendentes que podem crescer de uma maneira imortalizada.

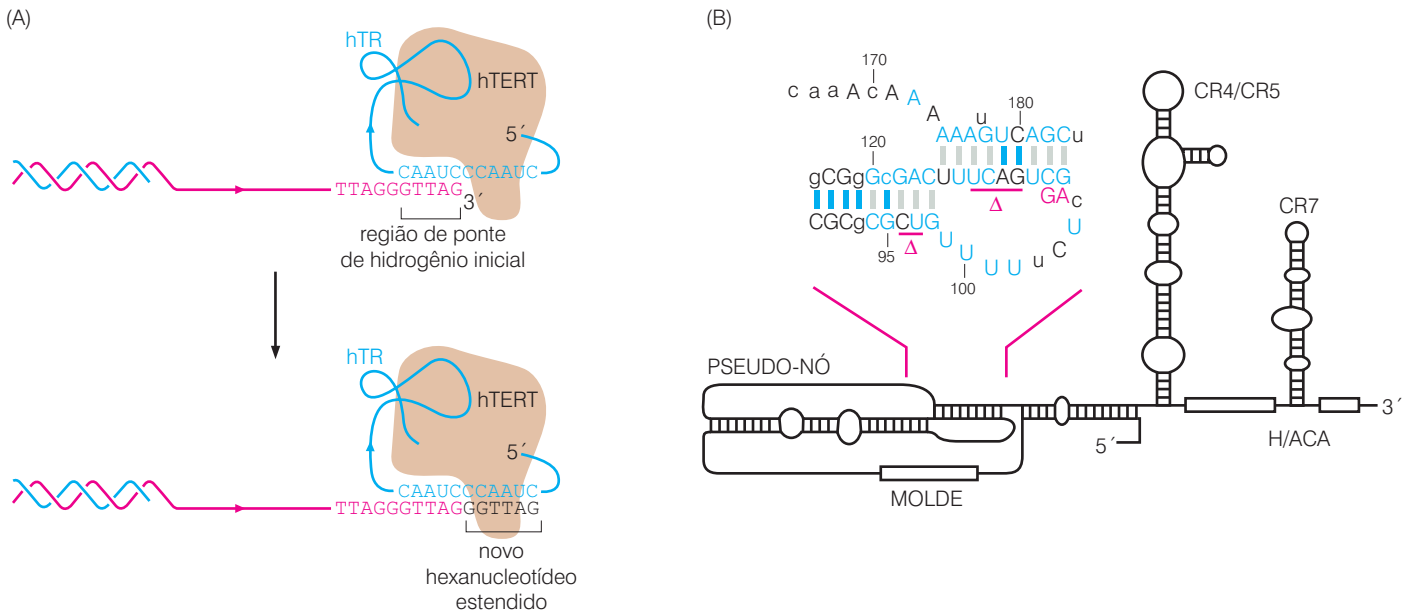


Figura 10.23 Estrutura da holoenzima telomerase humana (A) A holoenzima telomerase humana é composta de no mínimo duas subunidades essenciais, a subunidade catalítica hTERT (*marrom-claro*) e a subunidade de RNA *hTR* associada (*azul*). (No mínimo outras oito subunidades podem existir na holoenzima, porém essas não têm sido caracterizadas.) A holoenzima se liga à extremidade 3' da fita rica em G sobressalente (*rosa*), fazendo isso, em parte, por meio de ponte de hidrogênio entre *hTR* e os últimos cinco nucleotídeos da fita rica em G. Subseqüentemente, por meio da transcrição reversa de seqüências presentes na subunidade *hTR*, hTERT é capaz de estender a fita rica em G

em seis nucleotídeos (*preto*). Repetindo esse processo, a enzima pode estender a fita rica em G por centenas, mesmo milhares de nucleotídeos. As pontas de flecha indicam a orientação 5' a 3' dos ácidos nucleicos. (B) A molécula *hTR* é formada de somente 451 nucleotídeos. No centro, está um "pseudo-nó", uma estrutura topologicamente complexa (*letras azuis*) que possui, dentre outros aspectos, uma hélice de três fitas. Condições humanas patológicas surgem de mutações (*rosa*) na seqüência, envolvendo tanto substituições quanto deleções (Δ) de bases, todas as quais comprometem a função de telomerase. (B, de C. A. Theimer, C. A. Blois, e J. Feigon, *Mol. Cell* 17: 671-682, 2005.)

Além disso, podemos concluir que a telomerase é eficiente deixando que as células enganem a crise, pois ela subverte as operações do relógio de gerações. Quando a telomerase é expressa em níveis significativos, os telômeros são mantidos em tamanhos que são compatíveis com a replicação ilimitada adiante. Em consequência, o relógio de gerações que depende do encurtamento progressivo dos telômeros é feito inoperante. As estratégias moleculares utilizadas por células cancerosas para desreprimir a expressão de *hTERT* e, desse modo, adquirir altos níveis de atividade de telomerase, são pouco esclarecidas (Barra lateral 10.5).

Com essas idéias em mente, os papéis biológicos normais de telomerase agora se tornam mais claros. Em espécies eucarióticas unicelulares, como ciliados e leveduras, o crescimento exponencial de células requer a presença contínua de altos níveis de atividade de telomerase para assegurar que os telômeros sejam mantidos indefinidamente em um tamanho que é compatível com a estabilidade cromossomal. Por meio da elongação do DNA telomérico, a telome-

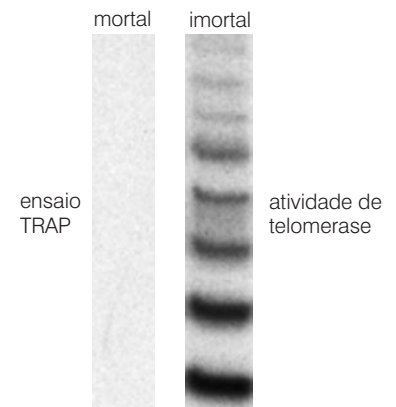


Figura 10.24 Ativação da atividade de telomerase após o escape da crise Linfócitos B individuais escapam com pouca frequência de uma população celular em crise, começam a crescer robustamente e são imortalizadas (veja a Figura 10.13A). Como visto aqui (*no topo*), as células "mortais" em pré-crise não apresentam atividade de telomerase, como medido pelo ensaio TRAP (Figura 10.21), enquanto as células espontaneamente imortalizadas ("imortais") apresentam uma atividade abundante. O mRNA de *hTERT*, o qual codifica a subunidade catalítica da holoenzima telomerase, está essencialmente ausente nas células em pré-crise, porém claramente presente nas células imortalizadas (*no centro*). Entretanto, níveis do RNA *hTR*, o qual funciona como um molde para hTERT durante o alongamento do DNA telomérico (Figura 10.23B), estão muito sutilmente aumentados (*abaixo*), sugerindo que os níveis da expressão de *hTERT* determinam os níveis da atividade enzimática na célula. (De M. Meyerson, C. M. Counter, E. N. Eaton et al., *Cell* 90: 785-795, 1997.)

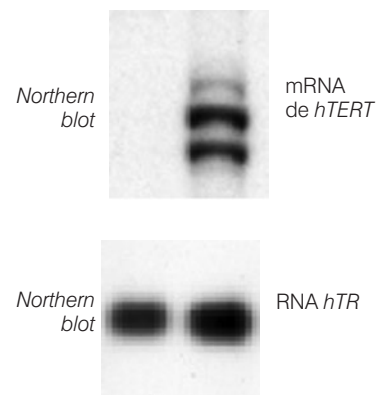
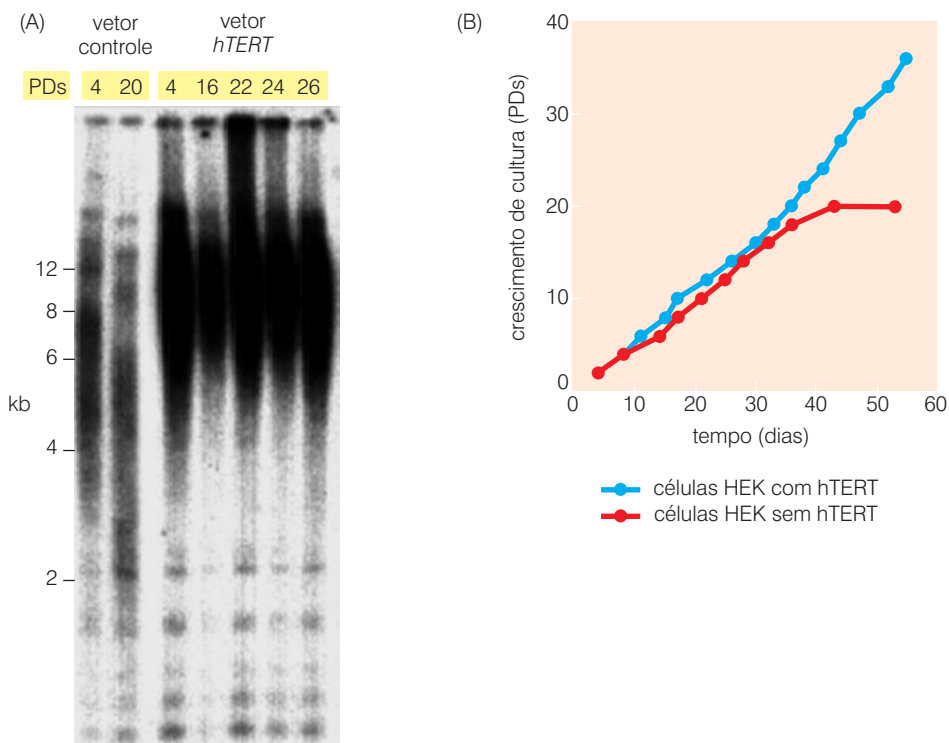


Figura 10.25 Prevenção de crise por meio da expressão de telomerase (A) Este *Southern blot* analisa os tamanhos de DNA telomérico que foram gerados pela clivagem do DNA genômico com uma enzima de restrição que não cliva dentro da sequência repetida de hexanucleotídeos dos telômeros (veja a Figura 10.13A). Esses DNAs são então marcados com uma sonda de DNA que reconhece essa sequência de hexanucleotídeos. Como visto, células de rim embrionário humano (HEK) telomerase-negativas infectadas com um vetor retroviral controle que não especifica nenhuma proteína carregam telômeros que diminuem em tamanho entre 4 e 20 duplicações de população (PDs; *duas canaletas da esquerda*). Entretanto, a infecção de tais células com um vetor retroviral especificando hTERT causa o aumento substancial do tamanho dos telômeros, mantendo seus tamanhos por 26 duplicações de população (*canaletas à direita*). (Em virtude desses telômeros serem muito maiores, eles geram um forte sinal no *Southern blotting*.) Os marcadores de tamanho são apresentados em quilobases. (B) Esta população de células de rim embrionário humano foi destinada a entrar em crise por 40 dias, o que equivale a cerca de 20 duplicações de população (PDs; *linha vermelha*). Entretanto, quando hTERT foi ectopicamente expresso nessas células (*linha azul*), elas adquiriram a capacidade de proliferar indefinidamente. (Cortesia de C. M. Counter e R. L. Beijersbergen.)



rase, nessas células de protozoários, é capaz de compensar a erosão continuada de DNA telomérico devido à sub-replicação de DNA terminal pela importante maquinaria de replicação de DNA. Sendo unicelular, esses eucariotos não precisam temer o câncer.

A expressão da atividade de telomerase é programada de forma diferente em metazoários complexos, notavelmente humanos. Em virtude da expressão de telomerase ser bastante reprimida em linhagens celulares pós-embrionárias, concede-se a essas somente um potencial replicativo pós-embrionário limitado antes de entrarem em crise. Essa limitação parece representar um componente-chave das defesas anticâncer do corpo humano.

Esse modelo mecanicista também fornece explicações convincentes de como as células humanas podem escapar da crise e se tornar imortalizadas. Ele falha, entretanto, para explicar um outro enigma bastante antigo: como a expressão de telomerase capacita determinados tipos de células cultivadas a evitarem a senescência (Barra lateral 10.6)?

Barra lateral 10.5 Oncoproteínas e proteínas supressoras de tumor exercem papéis importantes na coordenação da expressão de *hTERT* Os mecanismos que levam à desrepressão da transcrição de *hTERT* durante a progressão de tumor em humanos são complexos e ainda totalmente obscuros. Múltiplos fatores de transcrição parecem colaborar para a ativação do promotor de *hTERT*. Uma vez expressos, os transcritos de *hTERT* permitem a síntese de quantidades substanciais de proteína hTERT; a última, complexada com outras subunidades da holoenzima telomerase é suficiente para gerar altos níveis de atividade de telomerase. A proteína Myc, a qual atua

como um fator de transcrição que desregula o relógio do ciclo celular (Seção 8.9), também contribui para a transcrição de *hTERT*. Existem no mínimo duas sequências de reconhecimento para os fatores de transcrição bHLH semelhantes a Myc nos promotores dos genes *TERT* de camundongo e humano.

Além disso, a conexão entre a expressão de Myc e hTERT pode ser mostrada por experimentos biológicos. Por exemplo, uma linhagem celular de melanoma humano que expressa altos níveis de Myc e é tumorogênica tem sido isolada. Três clones de variantes dessa linhagem celular que exibem uma redução de oito vezes na expressão de Myc e que perderam a tumorogê-

genicidade têm sido isolados. Seus crescimentos tumorogênicos podem ser restaurados se forem suplementados com um construto genético que expresse *hTERT*. Além disso, nessas células, a perda de tumorogenicidade após a redução dos níveis de expressão de Myc pode ser grandemente atribuída, se não exclusivamente, a uma perda associada da expressão do gene *hTERT*. Em adição a Myc, Menina – o produto do gene supressor de tumor *MEN1* (Tabela 7.1) – se associa ao promotor de *hTERT*, porém reprime a transcrição de *hTERT*. Um papel repressivo semelhante tem sido atribuído ao fator de transcrição Sp1, cuja expressão é induzida por TGF- β .

Barra lateral 10.6 A telomerase também afeta a senescência replicativa Está razoavelmente claro que (1) o estresse fisiológico cumulativo, incluindo o estresse de cultura de tecido, dita o tempo de início de senescência replicativa e (2) essa senescência ocorre em células que ainda possuem telômeros bastante longos. No entanto, os telômeros parecem exercer um papel-chave na coordenação do início da senescência. Isso é indicado pelo fato de que em certos tipos celulares, como fibroblastos humanos cultivados, a senescência pode ser adiada pela expressão de hTERT antes do tempo esperado para a entrada em senescência replicativa.

Esse “quebra-cabeça” pode ser resolvido por observações que indicam que quando algumas células entram em senescência replicativa,

elas perdem muitas das fitas simples sobressalentes nas extremidades de seu DNA telomérico; essa perda ocorre aparentemente em resposta a algum tipo de estresse fisiológico celular. As extremidades teloméricas degradadas resultantes, as quais provavelmente não apresentam uma alça T, podem causar a liberação de um sinal de dano ao DNA, provocando, desse modo, uma parada na proliferação celular por p53 que é manifestada como o estado de crescimento senescente (Figura 10.26). Protegendo a fita simples sobressalente dessa degradação, hTERT evita o desencadeamento da senescência. Esse modelo, ainda a ser validado, implica que hTERT está envolvida na manutenção dessa fita simples de DNA telomérico sobressalente e na manutenção da longa região de dupla-fita do DNA telomérico.

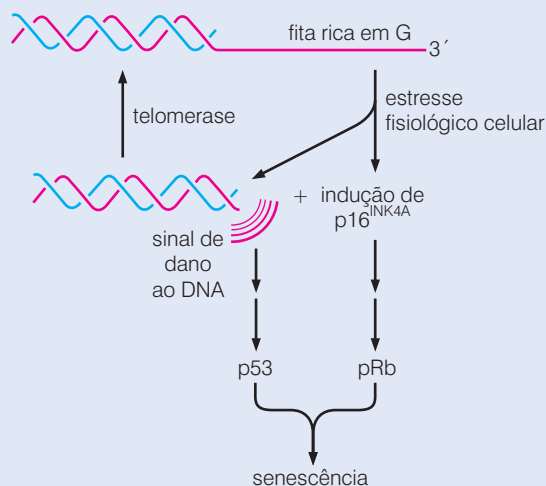


Figura 10.26 Senescência replicativa e as ações de telomerase Este diagrama apresenta um modelo mecanístico ainda especulativo de como e por que a expressão de telomerase (alcançada por meio da expressão ectópica da subunidade catalítica hTERT) pode prevenir as células humanas da entrada na senescência replicativa. A alça T que normalmente existe na extremidade do DNA telomérico (Figura 10.17), não é mostrada aqui. A fita sobressalente rica em G do DNA telomérico (rosa, *acima*) é bastante degradada em células que entram em senescência replicativa. Como indicado aqui, essa perda pode ser causada por certos estresses fisiológicos celulares. O DNA telomérico abrupto resultante pode então emitir um sinal de dano ao DNA que ativa p53. Junto com a expressão de p16^{INK4A} (Seção 8.4), a qual é ativada por estresse fisiológico celular, esse pode impor um estado de crescimento senescente. Revertendo essa perda da fita sobressalente rica em G, a telomerase é capaz de prevenir que certos tipos celulares, como fibroblastos humanos, entrem em senescência.

10.7 A telomerase exerce um papel-chave na proliferação de células cancerosas humanas

Os experimentos descritos anteriormente, utilizando células humanas em pré-crise em cultura, sugerem que a atividade de telomerase detectável na maioria de células cancerosas humanas exerce um papel causal na imortalização, e que essa imortalização é um componente-chave do estado de crescimento neoplásico. Esse modelo mecanicista tem sido testado experimentalmente por meio da supressão da atividade de telomerase em células cancerosas e seguindo suas respostas subsequentes. A atividade de telomerase pode ser reduzida por meio da expressão de RNA anti-senso nas células telomerase-positivas. Por exemplo, um RNA que é complementar em sequência à subunidade de RNA *hTR* da holoenzima telomerase (veja a Figura 10.23B) pode ser introduzido experimentalmente em células cancerosas humanas telomerase-positivas. Presume-se que tal molécula anti-senso anele à molécula *hTR*, formando uma dupla hélice RNA-RNA, bloqueando, desse modo, a capacidade da subunidade *hTR* de participar da síntese de DNA telomérico. É difícil alcançar a total inibição da função de *hTR* utilizando essa estratégia. Apesar disso, um experimento de anti-senso realizado com células HeLa causou a parada de crescimento destas 23 a 26 dias após elas serem inicialmente expostas ao RNA anti-senso.

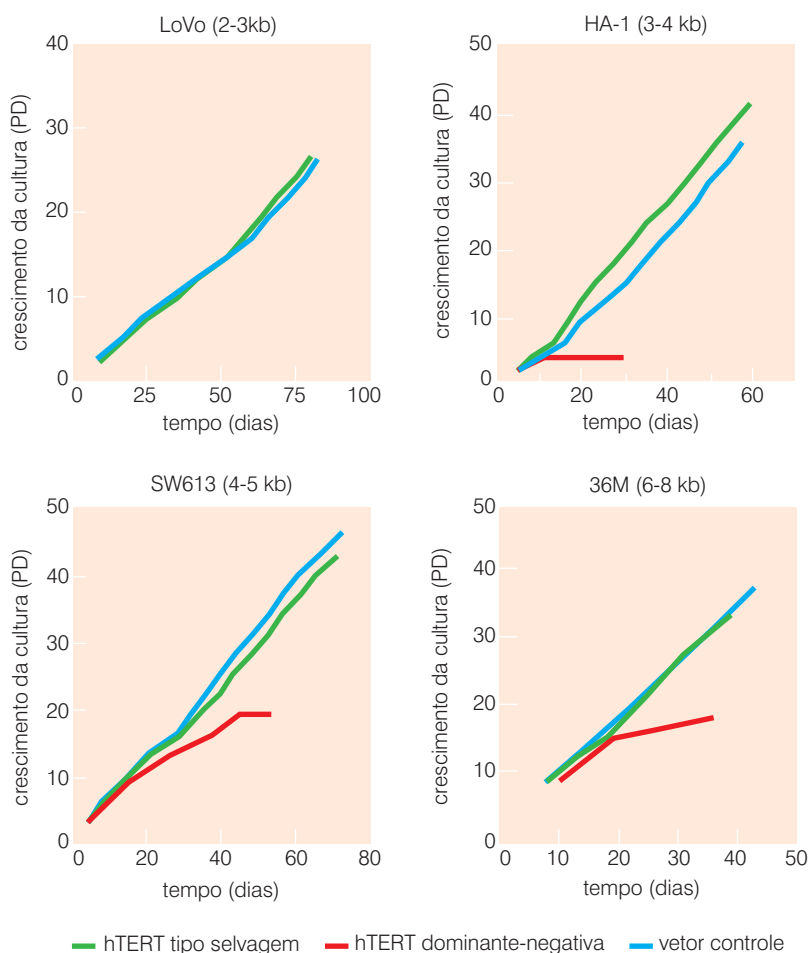
Uma estratégia experimental alternativa, que é mais eficiente, deriva do uso de uma enzima hTERT mutante que possui substituições de aminoácidos em sua fenda catalítica; tais alterações resultam em uma enzima cataliticamente inativa. Quando superexpressa em células telomerase-positivas, a proteína hTERT mutante pode atuar de uma maneira dominante-ne-

gativa (dn; veja a Seção 9.3) para interferir na atividade de telomerase endógena dessas células. A hTERT dn, que pode ser expressa em níveis muito maiores do que a proteína hTERT endógena, provavelmente se associa a outras subunidades que em geral se unem para formar a holoenzima telomerase e, assim, as monopoliza. Evidentemente, quando essas outras moléculas se associam à proteína hTERT dn, elas se tornam recrutadas em complexos improdutivos da holoenzima.

A expressão da subunidade hTERT dn em várias diferentes linhagens celulares tumorais humanas telomerase-positivas causa a perda de toda a atividade detectável de telomerase dessas células e, com algum atraso, a entrada em crise. A crise ocorre com um intervalo de 5 a 25 dias, dependendo do tamanho do DNA telomérico nessas células quando a subunidade hTERT dn foi introduzida. Células com telômeros que inicialmente possuíam 2 a 3 kb em tamanho entram em crise quase imediatamente, enquanto aquelas com telômeros que possuíam inicialmente 4 a 5 kb requerem 30 dias de passagens em cultura antes de entrar em crise (Figura 10.27). Essas reações atrasadas sugerem que, após a expressão de hTERT dn em células cancerosas, os telômeros progressivamente encurtam, e o processo de crise segue após o DNA telomérico inicialmente presente desgastar-se a um tamanho mínimo.

De maneira importante, a enzima hTERT dn não apresentou nenhum efeito no crescimento de células telomerase-positivas até o momento em que estas alcançaram a crise. Isso rejeita uma explicação alternativa: que a enzima mutante é intrinsecamente citotóxica e que seus efeitos na célula são atribuídos a alguma toxicidade inespecífica. Juntos, tais experimentos levam à conclusão de que as atividades contínuas da enzima telomerase são tão importantes

Figura 10.27 Supressão da atividade de telomerase e perda do programa de crescimento neoplásico. Vetores de expressão que especificam uma proteína hTERT mutante dominante-negativa (dn) (linhas vermelhas), uma enzima do tipo selvagem (linhas verdes) ou um vetor controle vazio (linhas azuis) apresentam efeitos muito diferentes em quatro linhagens celulares de câncer humano. Os respectivos tamanhos de seus DNAs teloméricos, como determinado por *Southern blots* TRF (veja a Figura 10.13) no início do experimento, são indicados em quilobases (kb). O vetor controle vazio e o vetor que expressa hTERT permitem a proliferação contínua dessas células, como medido em duplicações de população (PD). Entretanto, a introdução da enzima hTERT dn, a qual difere da enzima tipo selvagem por uma única substituição de aminoácido em sua fenda catalítica, causa a parada de crescimento nessas células, fazendo isso com atraso (em dias) após a introdução do vetor dn. O exame microscópico revelou que as células que cessaram a proliferação entraram em crise e mostraram apoptose difundida. Células da linhagem celular LoVo (acima, à esquerda) entraram em crise imediatamente após a expressão da enzima hTERT dn, e, desse modo, nenhuma célula esteve disponível para contagem. (De W. C. Hahn, S. A. Stewart, M. W. Brooks et al., *Nat. Med.* 5: 1164-1170, 1999.)



Barra lateral 10.7 A telomerase abastece o crescimento de alguns tumores pediátricos Neuroblastomas são tumores de células do sistema nervoso periférico (simpático) e são geralmente encontrados em crianças muito novas. Esses tumores são altamente variáveis, com alguns sendo reprimidos espontaneamente e outros progredindo em tumores metastáticos invasivos que por fim provam ser fatais. Como descrito anteriormente (Seção 4.5), o gene *N-myc* com frequência sofre amplificação nesses tumores, e maiores números de cópia de *N-myc* indicam um mau prognóstico para o paciente. A atividade de telomerase é um indicador de prognóstico bastante utilizado para o resultado final da doença. Como mostrado na Figura 10.28A, crianças cujos neuroblastomas são telomerase-negativos (como avaliado pelo ensaio TRAP) respondem bem à terapia, enquanto aquelas cujos tumores são telomerase-positivos, não. A expressão desses dois genes – *N-myc* e *hTERT* – está provavelmente ligada funcionalmente, já que o primo de *N-myc*, *myc*, já é conhecido por ser um forte indutor da transcrição de *hTERT* (Barra lateral 10.5). (Dinâmicas similares operam em um outro tumor infantil – o sarcoma de Ewing – o qual também pode surgir a partir de células do sistema nervoso periférico; Figura 10.28B.)

Alguns patologistas argumentam que neuroblastomas são extremamente comuns em muitas crianças jovens, e quase todos regredem de maneira espontânea e nunca se tornam clinicamente aparentes. As causas dessa regressão e a benignidade resultante de muitos neuroblastomas detectados clinicamente que respondem bem ao tratamento podem agora ter uma explicação molecular; sem a expressão significativa de *hTERT*, células de neuroblastoma perdem os telômeros e progridem para a crise, da qual elas falham em sair.

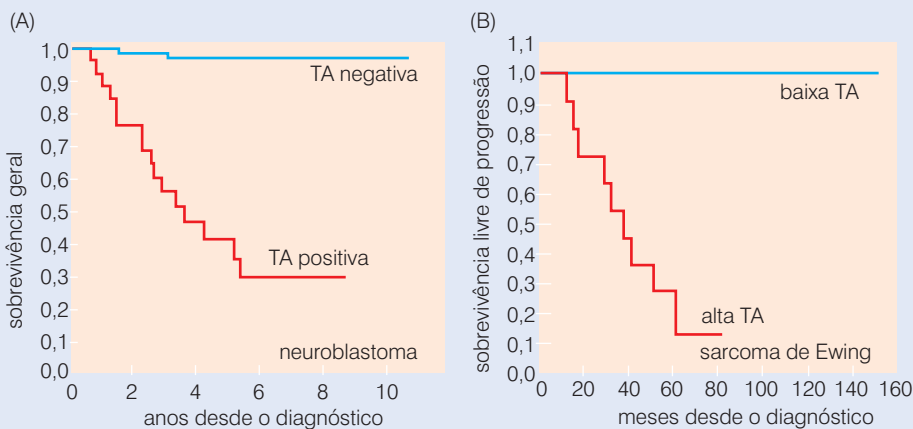


Figura 10.28 A atividade de telomerase e o prognóstico de tumores pediátricos O gráfico de Kaplan-Meier foi utilizado para ilustrar a sobrevivência livre de eventos (ou sobrevivência livre de progressão) de um grupo de pacientes em função do tempo após o diagnóstico ou tratamento. (A) Neste caso, pacientes com neuroblastoma pediátrico que não receberam nenhum tratamento quimioterápico citotóxico foram acompanhados por muitos meses (abscissa) após a apresentação clínica inicial. Esses pacientes foram divididos em dois grupos – aqueles cujos tumores apresentaram atividade de telomerase (TA) positiva (vermelho) e aqueles cujos tumores pareceram não apresentar essa atividade (azul); outro critério de estágio de tumor não foi incluído no estabelecimento desses grupos. A ordenada indica a sobrevivência geral, ou seja, a proporção de pacientes que permaneceram vivos por muito tempo após o tratamento inicial. (B) Um estudo similar de crianças com sarcoma de Ewing foi realizado, no qual pacientes foram divididos em dois grupos, dependendo se seus tumores apresentam alta (vermelho) ou baixa (azul) atividade de telomerase. Neste caso, a ordenada indica a proporção de crianças que passaram por sobrevivência livre de progressão, ou seja, aquelas cujos tumores não avançaram além do estágio inicialmente encontrado na clínica. (A, de C. Poremba, C. Scheel, B. Hero et al., *J. Clin. Oncol.* 18: 2582-2592, 2000; B, de A. Ohali, S. Avigad, I. J. Cohen et al., *J. Clin. Oncol.* 21: 3836-3843, 2003.)

para a proliferação dessas células cancerosas quanto para as ações de oncogenes e para a inércia de genes supressores de tumor. Esta conclusão é estendida e fortalecida pelos surpreendentes resultados de estudos de determinados tumores pediátricos humanos (Barra lateral 10.7).

Respondendo a essas diversas descobertas, alguns pesquisadores têm utilizado uma analogia automotiva para ilustrar o crescimento de células cancerosas humanas: oncogenes ativadas são ditos serem parecidos aos pedais de aceleradores que são presos ao chão do carro; genes supressores de tumor são comparados a sistemas de freios defeituosos; e a telomerase é colocada como um agente que assegura que o carro em fuga possua um suprimento próprio e infinito de gasolina em seu tanque.

10.8 Algumas células imortalizadas podem manter telômeros sem a telomerase

Como observado anteriormente, 85 a 90% de tumores humanos têm sido encontrados como telomerase-positivos. Os restantes 10 a 15% não apresentam uma atividade detectável de enzima, e, ainda, as células dentro desse segundo grupo de tumores são presumivelmente

cobertas com a necessidade de manter seus telômeros acima de um tamanho mínimo a fim de proliferar indefinidamente. Na realidade, essas células têm aprendido a manter seus DNAs teloméricos por meio de um mecanismo que não depende das ações de telomerase.

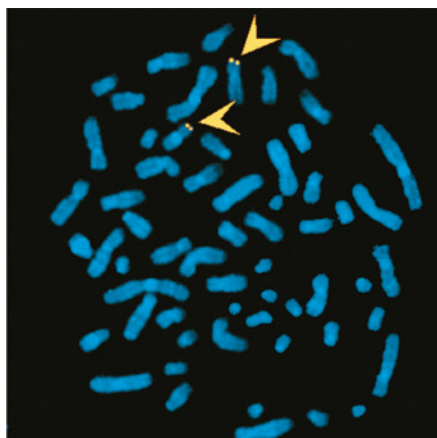
Esse mecanismo não baseado em telomerase foi primeiramente descoberto na levedura *Saccharomyces cerevisiae* seguindo a inativação de um dos diversos genes de levedura que codificam subunidades da holoenzima telomerase. Células mutantes de levedura logo entram em um estado que é análogo à crise em células de mamíferos. A grande maioria das células morre, porém variantes raras surgem dessas populações de células em processo de morte que utilizam o mecanismo ALT (alongamento alternativo dos telômeros), o qual é independente de telomerase, para construir e manter seus telômeros. O mecanismo ALT também é utilizado pela minoria das células tumorais humanas que não apresentam atividade significativa de telomerase.

Detalhes dos mecanismos moleculares utilizados por células humanas ALT-positivas para manter seus telômeros são pouco entendidos. Uma pista importante, entretanto, vem de um experimento no qual um marcador molecular rastreável – um gene de resistência a neomicina – foi introduzido no centro da sequência repetida do telômero de um cromossomo carregado por uma célula mamífera no estado ALT. Quando os DNAs teloméricos foram examinados nos descendentes dessa célula, cópias desse marcador molecular foram encontradas em vários outros telômeros também (Figura 10.29). Portanto, a informação da sequência parece ser trocada entre os telômeros de células no estado ALT.

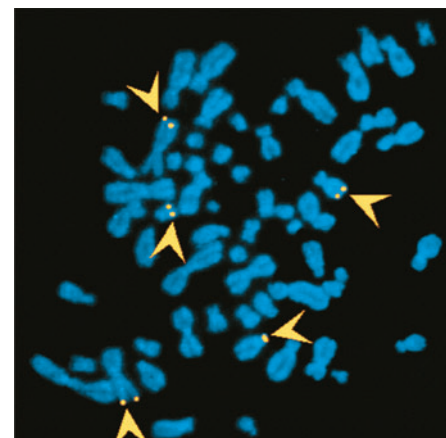
Essa troca de informação de sequência parece depender de um tipo de mecanismo intercromossomal de **cópia-escolha** (Figura 10.30). Assim, a polimerase responsável pela replicação do DNA no cromossomo pode, por um curto período, utilizar sequências de um segundo cromossomo como um molde para o alongamento de uma fita nascente de DNA antes de retornar ao cromossomo original para continuar a replicação do DNA deste cromossomo. Em consequência, as DNAs polimerases “copiam” a informação da sequência do segundo cromossomo a fim de incorporá-la à nova cópia sintetizada do primeiro cromossomo.

As identidades das enzimas que são utilizadas por células cancerosas humanas ALT-positivas para manter seus telômeros permanecem evasivas. Se pudermos extrapolar do comportamento de células de leveduras, algumas das enzimas envolvidas no reparo de DNA podem contribuir para a manutenção telomérica em células humanas ALT. Por exemplo, em células de leveduras que têm sido privadas de um dos genes envolvidos em *reparo de pareamento incorreto* de DNA (a ser descrito na Seção 12.4), o estado ALT é prontamente ativado. Já que uma das funções do reparo de pareamento incorreto é suprimir a recombinação imperfeita entre sequências de DNA homólogas, essa descoberta embasa a idéia de que a recombinação intercromossomal é um importante componente mecanístico do estado ALT.

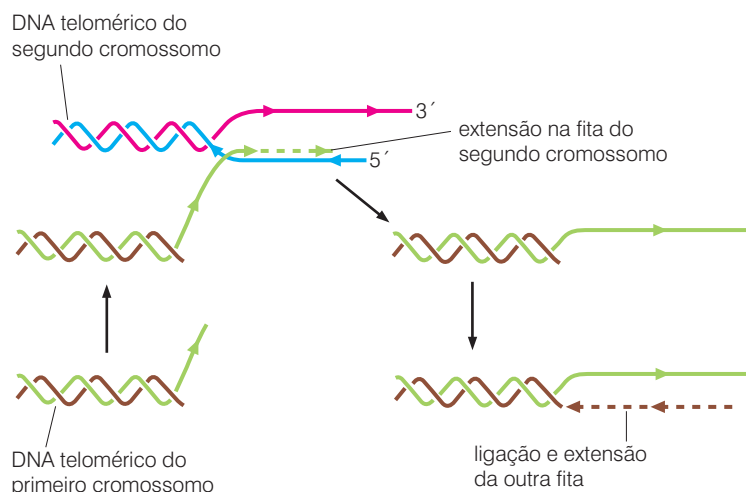
Figura 10.29 O mecanismo ALT O mecanismo de alongamento alternativo de telômero (ALT) pode depender, ao menos em determinadas células, da troca de informação de sequência entre os telômeros de diferentes cromossomos. Como visto aqui, dois dos telômeros de células humanas GM847 foram marcados por meio da inserção direcionada (utilizando recombinação homóloga) de um marcador genético em um de seus telômeros. No momento da análise, o marcador já estava presente nos dois telômeros (*setas, quadro da esquerda*). Após quarenta duplicações de população, essa sequência poderia estar associada a cinco cromossomos distintos (*setas, quadro da direita*). Em ambos os casos, a técnica de hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) foi utilizada para detectar essas sequências marcadoras em preparações cromossomais de metáfase. (De M. A. Dunham, A. A. Neumann, C. L. Fasching, R. R. Reddel, *Nat. Genet.* 26: 447-450, 2000.)



células de primeira passagem



após 40 duplicações de população



A existência de um mecanismo ALT enfatiza o fato de que todos os tipos de células cancerosas humanas devem desenvolver maneiras para manter seus telômeros acima de um certo tamanho mínimo a fim de proliferar de uma maneira imortalizada. A maioria das células cancerosas humanas desreprimem a expressão do gene *hTERT*, e uma pequena minoria de células cancerosas incipientes encontra uma forma de ativar o mecanismo ALT.

O estado ALT está associado preferencialmente a um subconjunto específico dos tumores encontrados em clínica oncológica. Esses incluem talvez metade de osteossarcomas e sarcomas de tecido mole, assim como glioblastomas. Talvez um dia essas associações possam ser explicadas pelo fato de que o espectro de proteínas – aparentemente proteínas de reparo de DNA – que são expressas nesses tipos particulares de tipos celulares de câncer permite ao estado ALT ser ativado mais rapidamente do que na maioria dos outros tipos de células cancerosas.

Entretanto, no momento, as razões precisas pelas quais um mecanismo (envolvendo *hTERT*) é geralmente favorecido em relação ao outro (ALT) permanecem obscuras. Igualmente obscuros são os mecanismos que causam o crescimento de DNA telomérico de células humanas no estado ALT a tamanhos (> 30 kb) maiores do que aqueles geralmente verificados em células telomerase-positivas (5 a 10 kb). De maneira importante, a enzima *hTERT* dn (Seção 10.7), a qual é capaz de induzir a crise em várias linhagens de células cancerosas humanas telomerase-positivas, falha em induzir o processo de crise em linhagens de células tumorais humanas ALT-positivas, fornecendo o suporte das idéias (1) de que células ALT-positivas não dependem da telomerase para seu crescimento e (2) de que a enzima *hTERT* dn não é intrinsecamente citotóxica.

A enzima *hTERT* representa um alvo muito atrativo para aqueles pesquisadores que têm a intenção de desenvolver novos tipos de terapias anticâncer. O estado ALT, entretanto, abrange importantes implicações para tal desenvolvimento. Como aprenderemos no Capítulo 16, as fendas catalíticas de enzimas como *hTERT* podem, freqüentemente, ser bloqueadas por moléculas de drogas terapêuticas altamente específicas. De forma significativa, *hTERT* é um parente distante da transcriptase reversa do vírus da imunodeficiência humana (HIV; veja a Figura 10.22), contra o qual drogas inibidoras efetivas têm sido desenvolvidas com sucesso. Esses sucessos existentes aumentam bastante a chance de compostos anti-*hTERT* serem produzidos um dia. Além disso, essa enzima é expressa na grande maioria de cânceres humanos, enquanto não está presente em níveis significativos em tecidos normais. Isso oferece a perspectiva de seletividade da droga – sendo capaz de afetar células cancerosas enquanto deixa as células em tecidos normais intocadas.

Imagine que um inibidor de *hTERT* é, de fato, desenvolvido por uma companhia farmacêutica – um objetivo que tem sido evasivo até o momento. Já está claro que no mínimo 10% dos tumores humanos nunca responderão a tal droga antitelomerase, pois são ALT-positivos e, assim, não

Figura 10.30 Escolha da cópia A troca de informação de sequência entre telômeros que ocorre em ALT (Figura 10.29) pode ter sua base em DNAs polimerases que utilizam mais de um cromossomo como molde durante a replicação cromossomal. Conforme um mecanismo plausível, um telômero (marrom e verde, abaixo, à esquerda) estende sua extremidade 3' sobressalente (verde), a qual desloca uma fita da mesma polaridade (rosa) no telômero de um outro cromossomo, permitindo que esta extremidade 3' se anele à fita complementar (azul) desse outro telômero. Uma vez estando associada a outro telômero, DNAs polimerases convencionais podem estender essa fita (linha verde tracejada), utilizando a fita complementar (azul) como molde (acima). Subseqüentemente, a fita rica em G alongada pode se desligar da fita complementar (azul) (à direita). Essa fita rica em G recentemente alongada pode ser convertida na forma dupla-fita por outras DNAs polimerases (linha marrom tracejada, abaixo à direita). Isso pode se repetir por dezenas de vezes, resultando na transferência de informação de sequência de um telômero a outro e no alongamento de telômeros por muitas quilobases sem o envolvimento da enzima telomerase. (Note que os telômeros com extremidades 3' sobressalentes podem ser criados na ausência de telomerase por meio das ações de exonucleases na fita rica em C.) As pontas de flechas indicam a orientação 5'-3' das fitas de DNA.

dependem dessa enzima para sua proliferação contínua. Enquanto os aproximadamente 90% de tumores humanos restantes, os quais exibem de fato uma atividade forte de telomerase, podem ser, inicialmente, suscetíveis aos efeitos letais dessa droga, mais cedo ou mais tarde células cancerosas variantes raras podem aparecer e ativar o mecanismo ALT. Isso permitirá que as variantes evitem as ações letais da droga antitelomerase. Em consequência, mesmo uma droga anti-telomerase que pode parecer, inicialmente, ser uma “bala de prata” (em virtude de sua capacidade de matar seletivamente um diverso arranjo de tipos de células tumorais humanas) pode ser enganada pelos genótipos em modificação e fenótipos de células cancerosas.

10.9 Os telômeros exercem papéis diferentes nas células de camundongos de laboratório e em células humanas

Nossas descrições de expressão de telomerase referem-se, repetidamente, a suas ações em células humanas, por uma boa razão. Células de roedores, especificamente aquelas das cepas de camundongo de laboratório, controlam a expressão de telomerase de uma maneira totalmente diferente. Enquanto células humanas reprimem a expressão de hTERT a baixos níveis em quase todas as linhagens celulares pós-embrionárias, as células em tecidos comparáveis de camundongo de laboratório continuam a expressar níveis significativos de telomerase por toda a vida. Isso tem consequências importantes para o papel de telômeros na biologia celular de murinos e, portanto, para a suscetibilidade relativa de células humanas e de camundongo à transformação maligna.

A expressão de telomerase por toda a vida em tecidos murinos é provavelmente a causa dos telômeros relativamente longos normalmente encontrados nessas células de camundongos de laboratório; a região de dupla-fita de seu DNA telomérico é muito mais de 30 a 40 kb em tamanho — cerca de cinco vezes maior do que o DNA telomérico humano correspondente. De fato, os telômeros de camundongo são tão longos que nunca estão em perigo de sofrerem erosão a tamanhos criticamente curtos durante o tempo de vida de um camundongo, mesmo quando a expressão da telomerase de camundongo é experimentalmente suprimida.

Os tamanhos de telômeros de camundongos permitem que linhagens celulares passem por um número maior de gerações replicativas do que o requerido para a formação de tumor. Isso indica que camundongos de laboratório não contam com o tamanho de telômero para limitar a capacidade replicativa de suas linhagens celulares normais e que a erosão de telômero pode não servir como um mecanismo para compelir o desenvolvimento de tumor nesses roedores. No entanto, parece que o nível significativo de atividade de telomerase normalmente presente em células somáticas de camundongo e seus longos telômeros ainda não são suficientes para o forte crescimento de células tumorais nesses animais (Barra lateral 10.8).

Para mensurar que células derivadas de camundongos de laboratório mostram capacidade limitada de replicação *in vitro*, essa capacidade nunca é determinada por meio do encurtamento de telômero. Em contraste absoluto ao comportamento de células humanas, as células de camundongo podem ser imortalizadas de uma maneira relativamente fácil seguindo a propagação estendida em cultura (a qual seleciona para células que são espontaneamente imortalizadas *in vitro*). Células humanas requerem, em vez disso, a introdução do oncogene *large T* de SV40 (para evitar a senescência) e do gene *hTERT* (para evitar o processo de crise).

Essas diferenças sugerem que um dos mecanismos centrais que governam a biologia celular humana — o encurtamento de telômero — é irrelevante para a biologia de células de camundongos, pelo menos aquelas de camundongos de laboratório. O argumento biológico por trás dessas diferenças interespecies na organização de um importante circuito de controle celular permanece desconhecido. Uma atraente especulação é que humanos, nos quais as células passam por aproximadamente 10^{16} mitoses em um tempo de vida médio, possuem um maior risco de câncer do que camundongos, os quais apresentam somente em torno de 10^{11} divisões celulares (ou seja, camundongos possuem somente em torno de 0,1% das células de humanos e vivem, em média, somente em torno de 1% de uma vida humana). Esse número 10^5 vezes maior de divisões celulares em humanos pareceria criar um risco de câncer no tempo de vida proporcionalmente maior, tornando necessário, para grandes mamíferos de vida longa, como os humanos, desenvolver mecanismos

Barra lateral 10.8 Telômeros longos não são suficientes para a formação de tumores Experimentos com diversas cepas de camundongos transgênicos mostram que a hTERT homóloga de camundongo, chamada mTERT, confere alguma função que contribui para a tumorogênese mesmo quando as células de camundongo em que essa enzima atua já possuem telômeros muito longos (> 30kb). Por exemplo, uma cepa de camundongos transgênicos construída para superexpressar mTERT em queratinócitos basais da pele mostra um aumento de duas vezes na taxa de câncer de pele, enquanto outra cepa de camundongos que superexpressa mTERT em uma variedade de tecidos mostra um risco bastante aumentado de carcinomas mamários. Também é verdade que a atividade de mTERT, a qual já está presente em níveis consideráveis em células normais de camundongo, aumenta progressivamente durante o desenvolvimento de tumor em camundongo. Claramente, a enzima mTERT auxilia a tumorogênese por meio de mecanismos diferentes da simples extensão de telômero. Já que é provável que a enzima TERT atue muito em telômeros, é possível que essa função adicional envolva a proteção da fita simples sobressalente da fita rica em G nas extremidades de telômeros (veja a Barra lateral 10.6).

antitumor adicionais além daqueles que operam em pequenos mamíferos de vida curta, como camundongos. (Tentativas de esboçar as conclusões amplas e generalizadas dessas diferenças interespecíficas são complicadas pelo fato de que determinadas cepas de camundongos tipo selvagem controlam sua telomerase e telômeros de modo semelhante ao dos humanos).

O papel de telômeros na vida de camundongos tem sido revelado por pesquisadores que têm inativado (veja a Barra lateral 7.10) o gene que codifica a subunidade *mTR* do RNA de telomerase na linhagem germinativa de camundongo. Como esperado, a prole mutante homozigota de camundongos heterozigotos inicialmente criados carregando o alelo *mTR* mutante não exibiu atividade de telomerase em quaisquer de suas células. Durante seu tempo de vida, os telômeros desses camundongos telomerase-negativos podem encurtar de aproximadamente 30 kb para em torno de 25 kb; este tamanho ainda está longe do requerido para a proteção das extremidades de telômeros.

Esses camundongos telomerase-negativos são fenotipicamente indistinguíveis de camundongos do tipo selvagem. Essa ausência de qualquer fenótipo mutante que possa ser observado fornece evidências convincentes de que a enzima telomerase não exerce um papel essencial nos tecidos desses mamíferos além da sua tarefa de manutenção de telômeros.

Os camundongos homozigotos telomerase-negativos (i. e., *mTR*^{-/-}) podem ser cruzados com um outro por no mínimo mais três gerações sem apresentar qualquer fenótipo diferenciado. Finalmente, entretanto, na quinta geração de camundongo, os camundongos telomerase-negativos começam a mostrar fenótipos diferenciados – uma indicação de que após cinco gerações sem telomerase, seus telômeros sofrem erosão a tamanhos perigosamente curtos (Figura 10.31). Esses camundongos *mTR*^{-/-} de quinta geração e, até mesmo mais, sua progênie na sexta geração, são fracos e mostram uma capacidade diminuída para curar ferimentos, indicativo da incapacidade de suas células de responder apropriadamente a sinais mitogênicos. Os camundongos *mTR*^{-/-} de sexta geração também sofrem de uma redução substancial na fertilidade.

Os camundongos *mTR*^{-/-} que nascem na sexta geração já exibem telômeros bastante curtos no nascimento, e sua incapacidade em manter subsequentemente esses telômeros, particularmente em tecidos mitoticamente ativados, resulta na morte celular difundida e na perda de função tecidual. Por exemplo, tecidos altamente proliferativos, como o epitélio gastrointestinal, o sistema hematopoietico e os testículos, mostram uma substancial **atrofia** (perda de células). Essas observações são impressionantes e sem comparação no campo de genética de camundongo, pois demonstram fenótipos que somente se manifestam cinco ou seis gerações após uma mutação ter sido introduzida na linhagem germinativa desses animais.

Além disso, tais observações demonstram dramaticamente as diferenças entre os telômeros de células humanas e desses camundongos mutantes de laboratório. Os telômeros humanos

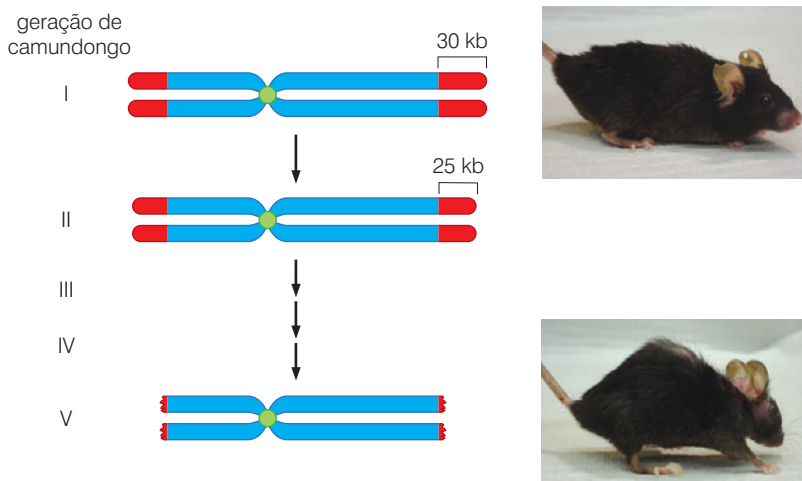


Figura 10.31 Erosão de telômeros por múltiplas gerações em populações de camundongos *mTR*^{-/-}. Durante os tempos de vida da primeira geração de camundongo *mTR*^{-/-}, seus telômeros, os quais apresentam inicialmente 30 kb em tamanho (vermelho), são reduzidos em tamanho por cerca de 5 kb (esquerda). Esses camundongos (acima, à direita) são fenotipicamente normais, assim como seus descendentes na segunda e terceira gerações. Entretanto, na quarta e quinta gerações, os telômeros dessas células se desgastam a um tamanho que não podem proteger as extremidades dos cromossomos; os tecidos desses camundongos começam a perder sua capacidade de se renovar na cicatrização de ferimentos, e esses camundongos começam a apresentar sintomas de envelhecimento prematuro, incluindo destruição de tecidos musculares e um arqueamento para trás (abaixo, à direita). Os tamanhos relativos dos telômeros dessas imagens foram aumentados em mil vezes em razão da ilustração. (Cortesia de R. S. Maser e R. A. DePinho.)

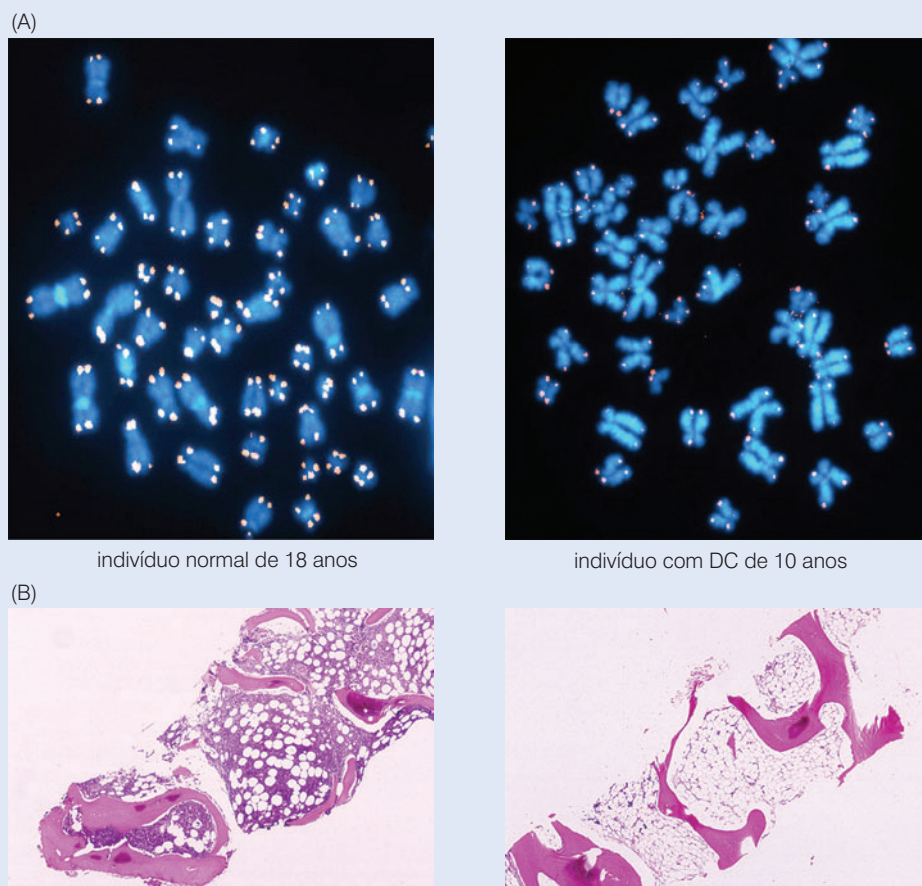
iniciam relativamente curtos, e a perda da atividade de telomerase pode levar, já na primeira geração, a graves fenótipos (Barra lateral 10.9).

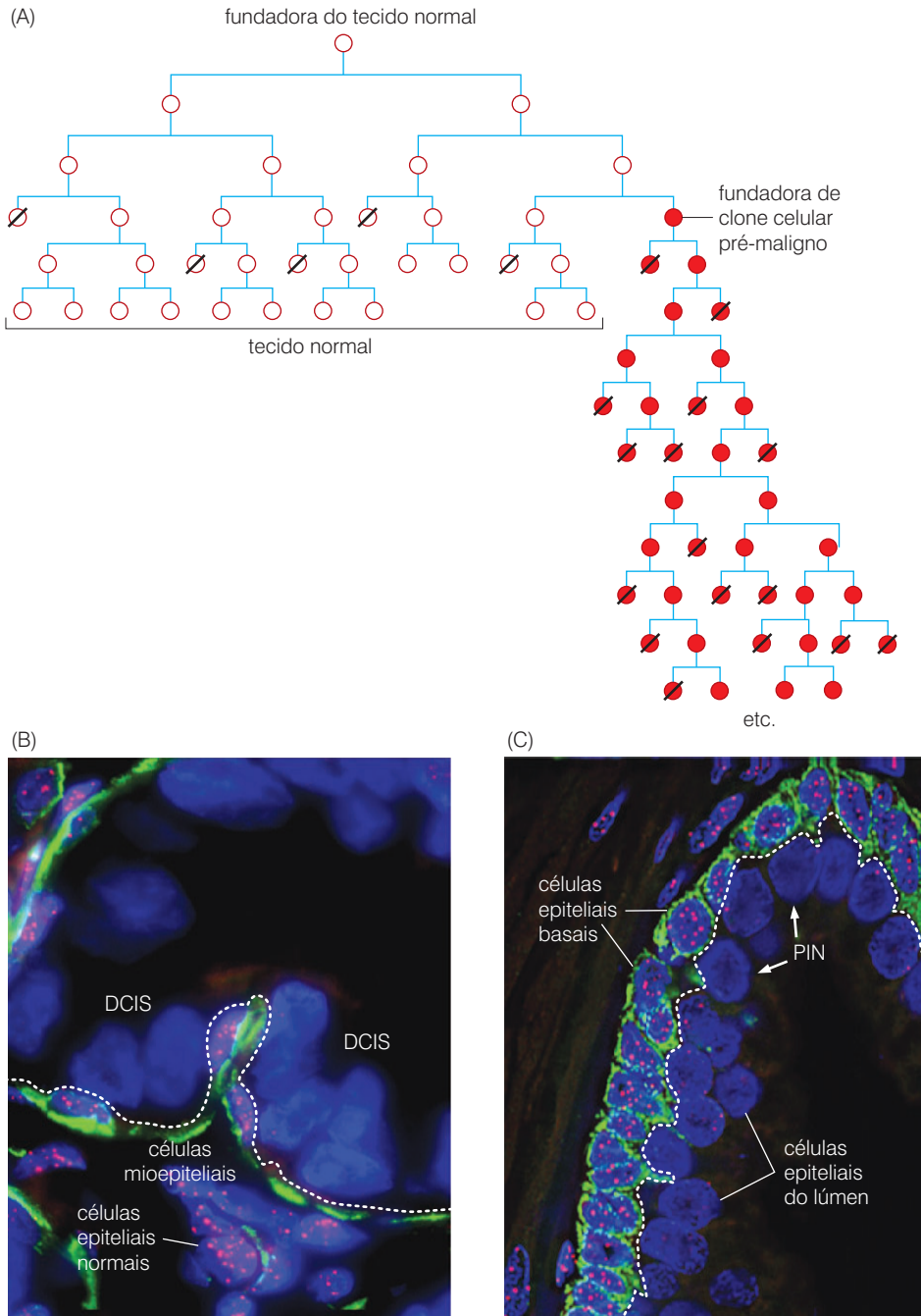
10.10 Camundongos telomerase-negativos mostram tanto suscetibilidade diminuída quanto aumentada ao câncer

Camundongos de laboratório são suscetíveis a cânceres espontâneos, em grande parte linfomas e leucemias. Essa suscetibilidade pode ser aumentada por meio da introdução experimental de mutações específicas (Barra lateral 7.10) na linhagem germinativa de camundongo, as quais causam a inativação de genes supressores de tumor ou a ativação de proto-oncogenes. Por que o tamanho dos telômeros criticamente curtos na quinta e na sexta gerações de camundongos telomerase-negativos afeta a taxa de câncer nesses animais?

Barra lateral 10.9 A função defectiva de telomerase explica uma rara síndrome humana familiar. Humanos que sofrem de uma condição herdada conhecida como disqueratose congênita exibem defeitos em tecidos altamente regenerativos, como a pele e a medula óssea, assim como uma reduzida estabilidade cromossomal. Na forma ligada ao X dessa doença, uma proteína conhecida como disquerina está ausente ou em mau funcionamento. A disquerina se associa à subunidade de RNA associada à telomerase (*hTR*) e auxilia *hTR* a se ajustar no complexo da holoenzima telomerase (veja a Figura 10.23). Uma versão autossômica dominante da mesma doença é causada pela herança de um gene *hTR* defectivo. Células de tecidos em proliferação de indivíduos afetados exibem cromossomos dicêntricos, os quais são indicativos de fusões intercromossomais. Alguns indivíduos afetados sucumbem a um colapso de seu sistema hematopoiético devido à perda da capacidade regenerativa das células-tronco em sua medula óssea (Figura 10.32).

Figura 10.32 O colapso de telômero e medula óssea de pacientes com disqueratose congênita. Humanos que sofrem de disqueratose congênita (DC) passam por uma atrofia de vários tecidos, que é rastreável pela ausência de telomerase funcional e ao colapso catastrófico de seus telômeros. (A) Hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) tem sido utilizada para detectar os telômeros em metáfase difundida de cromossomos em uma célula de um indivíduo normal de 18 anos (esquerda), assim como em uma célula de um indivíduo de 10 anos que sofre de DC. Muitos dos cromossomos das células deste último apresentam telômeros que são tão curtos que não podem ser detectados por FISH. (B) A maioria das atrofias teciduais que ameaçam a vida de pacientes com DC ocorre entre as células da medula óssea que proliferam rapidamente. Como indicado aqui, no osso normal (quadro da esquerda), regiões entre o osso mineralizado (rosa) são preenchidas com células hematopoiéticas da medula (roxo). Entretanto, células na medula de pacientes com disqueratose, que sofrem de mutações de linhagem germinativa no gene *hTR* (quadro da direita; veja também a Figura 10.23B), estão quase totalmente ausentes, pois as células-tronco desses pacientes perderam a capacidade de manter as diversas linhagens de células hematopoiéticas. (A, cortesia de S. Kulkarni e M. Bessler; B, cortesia de M. Bessler.)





A resposta para essa questão parece ser clara. Podemos imaginar que a deterioração de células nesses camundongos *mTR*^{-/-} leva a apenas um número adequado de células saudáveis para a sustentação do tecido e a viabilidade do organismo. Células-tronco encarregadas da tarefa de preencher os grupos de células diferenciadas nesses tecidos provavelmente terão grande dificuldade em fazê-lo.

Já que células normais nesses tecidos são apenas capazes de se manter, células cancerosas incipientes deveriam ter uma mesma ou maior dificuldade. O processo de desenvolvimento de tumor requer que clones de células pré-malignas que se desenvolvem voltadas à malignidade devam passar por um grande número de ciclos de crescimento e divisão – um número substancialmente maior do que aquele sofrido por células normais próximas (Figura 10.33A). Conseqüentemente, qualquer desenvolvimento de tumor que é iniciado com sucesso por esses clones de células é provavelmente abortado antes de alcançar a finalização.

A fim de testar tais previsões, primeiramente, camundongos com tendência ao câncer foram construídos por meio da inativação de genes supressores de tumor em sua linhagem germinativa (Barra lateral 7.10), neste caso o loco codificante para as proteínas supressoras de tumor 16^{INK4A} e p19^{ARF} (Seções 8.4 e 9.7). Tais camundongos, como pode ser esperado, são muito suscetíveis ao câncer; realmente, eles com frequência desenvolvem linfomas e fibrossarcomas relativamente cedo na vida. Esta suscetibilidade é manifestada de forma mais severa quando eles são expostos a carcinógenos. Em um conjunto de experimentos, a exposição sequencial a dimetilbenzatranceno (DMBA), um potente carcinógeno, seguida por repetidas exposições a radiação ultravioleta B (UV-B), levou, após 20 semanas, a uma incidência de tumor de 90% nos camundongos mutantes (16^{INK4A}/p19^{ARF}-negativos), enquanto um grupo controle de camundongos tipo selvagem tratados de maneira similar não apresentou tumores durante esse período.

Esse experimento foi estendido por meio da introdução de 16^{INK4A}/p19^{ARF} inativados de linhagem germinativa em camundongos que também não possuíam *mTR*, o gene que codifica a subunidade do RNA da holoenzima telomerase de camundongo (veja a Figura 10.31). Os resultados foram que 64% de camundongos controle, telomerase-positivos e 16^{INK4A}/p19^{ARF}-negativos, contraíram tumores, enquanto somente 31% das gerações 4 e 5 de camundongos *mTR*⁻/16^{INK4A}/p19^{ARF}-negativos desenvolveram tumores. Esses resultados foram ainda mais surpreendentes quando a sobrevivência de camundongos foi verificada após 16 semanas: 88% dos camundongos telomerase-positivos foram perdidos para o câncer, enquanto somente 46% dos camundongos telomerase-negativos da quinta geração foram perdidos para essa doença.

Essa taxa de câncer reduzida em camundongos telomerase-negativos cumpriu a previsão de que os tecidos normais de camundongos *mTR*⁻ esgotaram a maioria de sua fundação de gerações replicativas mesmo antes da tumorogênese ter iniciado. Uma vez que os tumores tenham surgido nesses camundongos, populações de células tumorais incipientes passam por muitas duplicações adicionais antes de poderem criar tumores macroscópicos (veja a Figura 10.33A). Entretanto, relativamente cedo durante o curso de formação de tumor, essas células cancerosas aspirantes serão direcionadas para o processo de crise por meio do colapso de telômero, e a sua programação de formação de tumores será abortada. Sem dúvida, em tecidos humanos, as células pré-malignas que são colocadas a se tornarem completamente neoplásicas já demonstram telômeros drasticamente truncados; esse truncamento deve-se, aparentemente, ao fato de que essas populações celulares passam por muito mais ciclos celulares sucessivos do que células normais nas proximidades (Figura 10.33B e C).

Um resultado mais interessante e bastante diferente foi verificado quando camundongos sem ambas as cópias do gene *p53* em sua linhagem germinativa foram utilizados (em preferência à inativação de seu loco 16^{INK4A}/p19^{ARF}, como descrito anteriormente). De forma geral, a inativação da linhagem germinativa do gene *p53* em camundongos leva, propriamente, a um aumento da incidência de tumor e da mortalidade, refletindo aspectos da síndrome de Li-Fraumeni de humanos (Seção 9.12). O loco *mTR* mutante foi, então, introduzido no arquivo genético *p53*⁻ desses camundongos.

Quando o genótipo *p53*⁻ esteve presente nos genomas de camundongos *mTR*⁻ telomerase-negativos de quinta e sexta gerações, algo completamente inesperado foi observado: a taxa de formação de câncer foi significativamente *aumentada*, acima daquela criada pelo genótipo *p53*⁻ sozinho. Além disso, o espectro de tumores, especialmente linfomas e angiossarcomas, que são comumente verificados em camundongos *p53*⁻, foi substituído em favor de carcinomas – somente os tipos de tumores comumente verificados em humanos. Essas tendências tornam-se mais evidentes na sétima e oitava gerações de camundongos telomerase-negativos (Figura 10.34).

Como esses resultados intrigantes podem ser explicados? Podemos imaginar que, como camundongos de quinta e sexta gerações esgotam seus telômeros, suas células começam a passar por ciclos de quebra-fusão-ponte (BFB) cromossomal (veja a Figura 10.14) e, então, por processo de crise. Já sabemos que quebras de DNA dupla-fita, as quais são formadas em ciclos BFB, podem provocar apoptose por meio de uma via dependente de p53 (Seção 9.6). Portanto, células que carregam genes *p53* funcionais e passam por ciclos BFB são, provavelmente, eliminadas de forma rápida dos tecidos.

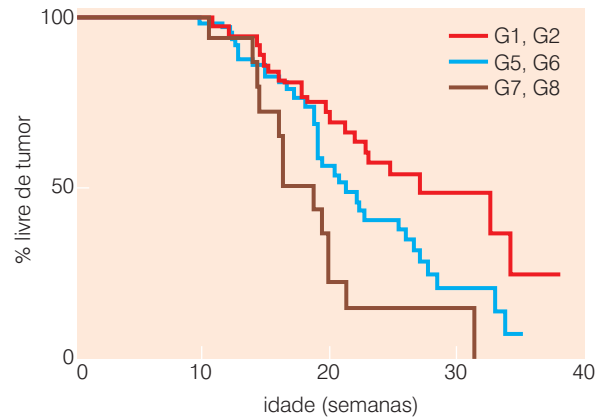


Figura 10.34 Taxa de formação de tumor em camundongos *mTR*^{-/-} *p53*^{-/-} com tendência ao câncer. Estes gráficos de Kaplan e Meier revelam que a incidência de tumor aumenta com o passar das gerações em camundongos que não apresentam os genes que codificam p53 e mTR em sua linhagem germinativa. Nas gerações 1 e 2 (G1, G2, *vermelho*), aproximadamente 50% dos camundongos apresentaram tumores prontamente detectáveis com a idade de 24 semanas, enquanto nas gerações 5 e 6 (G5, G6, *azul*) os camundongos desenvolveram tumores mais rapidamente. Na geração 7 ou 8 (G7, G8, *marrom*), aproximadamente 50% dos camundongos já exibiam tumores com 17 semanas de vida. (De L. Chin, S. E. Artandi, Q. Shen et al., *Cell* 97: 527-538, 1999.)

Como células de camundongos *mTR*^{-/-} *p53*^{-/-} de quinta e sexta gerações passam por ciclos BFB, elas podem lutar para se manterem vivas em virtude da quebra repetida de seu DNA cromossomal. Entretanto, muitas dessas células podem controlar sua sobrevivência, pois um componente-chave de sua maquinaria de resposta pró-apoptótica – p53 – está perdido. Essas células avançarão com dificuldade por meio de um número de ciclos de crescimento e divisão em contrariedade ao caos cariotípico que aflige seus genomas. Por todo esse tempo, seus cromossomos participarão de numerosos ciclos BFB.

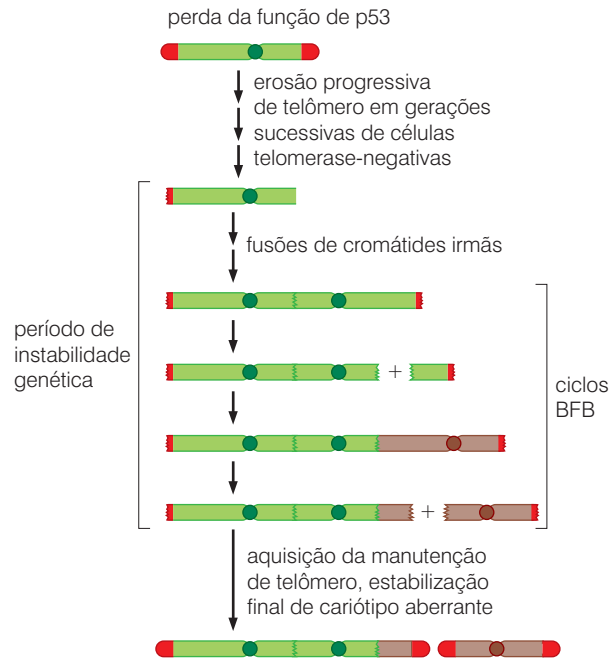
Esses ciclos podem continuar por muitas gerações celulares, já que p53 não estará precavida para desencadear a apoptose e eliminar essas células. Como uma consequência, os genomas de tais células se tornarão bastante misturados pelas translocações cromossomais não-recíprocas geradas pelos ciclos BFB. Além disso, e talvez até mais importante, há evidência de que a quebra de DNA dupla-fita leve à amplificação ou à deleção das regiões cromossomais adjacentes a essas quebras.

Enquanto esses ciclos BFB não provam ser imediatamente fatais para células p53-negativas, os ciclos certamente comprometerão a capacidade proliferativa delas. Isso quer dizer que células individuais dessas populações estarão sob uma grande pressão seletiva para escapar desses ciclos BFB e para readquirir estabilidade cariotípica; uma vez que o tenham feito, elas serão capazes de crescer mais rapidamente. Nessas células, entretanto, a aquisição da atividade de telomerase não é uma opção (em virtude da linhagem germinativa nocaute para as cópias do gene *mTR*). Por essa razão, essas células irão recorrer à ativação do sistema ALT de manutenção de telômero. Fazendo isso, elas estabilizarão quaisquer cariótipos aberrantes que possam ter aparecido desde quando seus ancestrais perderam os telômeros funcionais e começarão a crescer de uma maneira robusta novamente.

Claramente, os cariótipos misturados que essas células adquiriram geram novas combinações de genes (incluindo muitos genes translocados, deletados e amplificados), e, dentre os novos genótipos que são criados, provavelmente existirão alguns que *favoreçam* a proliferação neoplásica. Determinado de forma diferente, o período de instabilidade genética parece *aumentar* a probabilidade de que configurações genéticas promotoras de câncer sejam produzidas. Tais explicações plausíveis como o colapso de telômeros em células p53-negativas podem promover, na verdade, o desenvolvimento de tumores.

Esses camundongos *mTR*^{-/-} apresentam contrapartes humanas: pacientes que sofrem da síndrome de disqueratose congênita (veja a Barra lateral 10.9) freqüentemente desenvolvem câncer uma vez que seus sistemas hematopoiéticos de colapso tenham sido reconstruídos com sucesso por transplante de medula óssea. Alguns desenvolvem malignidades hematopoiéticas (mielodisplasia e leucemia mielogênica aguda) ou carcinomas do trato gastrointestinal. Essas neoplasias ocorrem naqueles tecidos que sofrem proliferação intensa e constante – precisamente os sítios onde os telômeros podem se tornar rapidamente desgastados na ausência de atividade de telomerase, resultando em repetidos ciclos de quebra-fusão-ponte.

Figura 10.35 Um modelo mecanístico de como ciclos BFB promovem a formação de carcinoma humano. Durante os passos iniciais da progressão de tumor, a inativação do gene supressor de tumor *p53* é frequentemente favorecida, pois ela permite que células cancerosas incipientes escapem da morte apoptótica devido a ativação de oncogene, níveis inadequados de sinais tróficos, anoxia e envenenamento por lixo metabólico devido à vascularização inadequada. Mais tarde, com a progressão do tumor, o DNA telomérico de populações celulares pré-malignas em desenvolvimento irá sofrer erosão abaixo do nível necessário para a proteção das extremidades cromossômicas. Ciclos de quebra-fusão-ponte (BFB) (veja a Figura 10.14) irão prosseguir e levarão ao aumento de rearranjos cromossômicos e à amplificação e deleção de segmentos cromossômicos adjacentes aos pontos de quebra (*não-mostrado*). Células que sofrem ciclos BFB seriam normalmente eliminadas por meio da apoptose induzida por *p53*. Entretanto, na ausência da função de *p53*, tais células podem sobreviver, embora com cariótipos misturados que irão diminuir sua proliferação, mas que não desencadearão sua morte apoptótica. Surgindo de tais populações celulares, estarão variantes que aprenderam como regenerar telômeros e, desse modo, estabilizar seu cariótipo; tais células podem mais uma vez crescer rapidamente. Em células de camundongos *mTR*^{-/-} mutantes (Figura 10.34), essa estabilização pode ser alcançada por meio da ativação do sistema ALT de manutenção de telômero, enquanto em organismos tipo selvagem (incluindo pacientes humanos com câncer), a desrepressão da expressão de *hTERT* permite a reconstrução de telômeros ao tamanho apropriado (*vermelho*). Uma vez que os telômeros tenham sido regenerados nas extremidades de todos os cromossomos, a geração seguinte da desordem cariotípica através de ciclos BFB será parada. Entretanto, qualquer desordem cariotípica que tenha sido gerada previamente durante ciclos BFB será perpetuada em populações celulares descendentes.



10.11 Os mecanismos que fundamentam a patogênese de câncer em camundongos telomerase-negativos também podem atuar durante o desenvolvimento de tumores humanos

Essas observações de camundongos geneticamente modificados, quando colocadas em conjunto, nos levam a considerar um modelo mecanístico mais interessante (Figura 10.35) que explica porque a aneuploidia é verificada na grande maioria de carcinomas humanos. Imagine que relativamente cedo no longo processo de desenvolvimento de tumor humano, as células de populações pré-malignas são capazes de se desfazer de suas cópias do gene *p53*. A pressão seletiva que favorece essa perda genética pode derivar, por exemplo, do fato de que as células de populações pré-malignas iniciais passam por anoxia e, então, sofrem de apoptose induzida por *p53*. De maneira alternativa, as cópias do gene *p53* podem ter sido perdidas por células cancerosas incipientes a fim de reduzir a probabilidade de apoptose desencadeada por oncogene (veja a Seção 9.6).

Algum tempo após a perda da função de *p53*, como a progressão de tumor faz, as células dessas populações pré-malignas começarão a sofrer um desgaste substancial de telômero e o colapso final deste, já que elas não apresentam níveis significativos de atividade de telomerase. Ciclos BFB repetidos irão seguir e resultar em aneuploidia. Entretanto, em virtude dessas células também não possuírem *p53* funcional, elas sobreviverão e continuarão a proliferar, embora lentamente.

Mais cedo ou mais tarde, nessa população de células que estão sofrendo ciclos BFB, uma célula que adquiriu a capacidade de desreprimir a expressão do gene *hTERT* surgirá, e, tendo ocorrido isso, esta também adquire a capacidade de estabilizar seu cariótipo e prevenir ciclos BFB adicionais. Com a telomerase, podemos imaginar que essas células irão reparar as extremidades de suas moléculas de DNA cromossômico e mais uma vez chegarão a um crescimento robusto. Evidentemente que o aparecimento tardio de telomerase na cena não pode colocar em ordem a considerável aneuploidia que é acumulada durante a janela de tempo que começou com o colapso de telômero e terminou com a aquisição da expressão do gene *hTERT*. (Os mesmos argumentos serão aplicados no momento em que o mecanismo ALT, em preferência à ativação de telomerase, é utilizado para proteger o genoma de ciclos BFB adicionais.)

Observações de progressão de câncer pancreático humano fornecem bases para esse modelo. Relativamente cedo no longo processo de múltiplas etapas de tumorigênese no pâncreas, as células mitóticas em adenomas de baixo grau apresentam poucas das pontes de anáfase que são características de ciclos BFB. Entretanto, adenomas altamente displásicos mais avançados mostram grandes números dessas pontes. Ainda, por último, carcinomas *in situ*, mais avançados, exibem, mais uma vez, baixos níveis de pontes de anáfase. Esse comportamento reforça o modelo descrito anteriormente, que propõe que ciclos BFB e a instabilidade cromossomal associada são encontrados somente em uma janela de tempo definida durante o curso de progressão de tumor de múltiplas etapas.

Um embasamento adicional para esse modelo vem de um estudo de carcinomas humanos de esôfago, cólon e mama. Em cada caso, os tumores que possuem telômeros relativamente curtos estão fortemente associados a um mau prognóstico a longo prazo, enquanto tumores que carregam longos telômeros estão associados a um prognóstico bastante melhor, incluindo uma maior sobrevivência a longo prazo. Mais uma vez, podemos imaginar que os cromossomos de células cancerosas com tamanhos de telômeros subótimos sofrem, freqüentemente, ciclos de quebra-ponte-fusão, talvez em virtude de expressarem hTERT em níveis que são adequados apenas para a manutenção do DNA telomérico. Esses ciclos BFB, por sua vez, criam uma instabilidade cromossomal que continua por toda a vida do tumor para gerar novos genótipos misturados, alguns dos quais podem favorecer fenótipos como proliferação mais rápida e agressividade aumentada. Determinadas condições inflamatórias crônicas humanas, as quais estão associadas ao risco aumentado de câncer, também podem ser atribuídas a telômeros desgastados e ciclos BFB (Barra lateral 10.10).

Esse modelo fornece um mecanismo atraente que explica como muitos tipos de células tumorais humanas adquirem cariótipos altamente aneuplóides. Embora não demonstrado diretamente, é bastante assumido que os genomas aneuplóides resultantes conferem vantagens de crescimento nessas células por meio da criação de novos oncogenes mediante translocações, aumentando a dose de proto-oncogenes promotores de crescimento e eliminando genes supressores de tumor que tinham segurado a proliferação celular. Portanto, esses ciclos BFB podem ser um instrumento na aceleração da progressão de tumor, pois eles aumentam a mutabilidade genômica e permitem o desenvolvimento de células pré-malignas a fim de explorar uma multidão de novos genótipos possivelmente vantajosos.

Essas especulações ainda não responderam uma questão levantada por algumas observações citadas anteriormente: os repetidos ciclos BFB em camundongos *mTR*^{-/-} *p53*^{-/-} afetam os *tipos* de tumores que estes apresentam, causando neles o desenvolvimento de carcinomas, os quais são comuns em humanos, em vez das malignidades hematopoiéticas e mesenquimais, que são freqüentemente verificadas em camundongos. Como a biologia do telômero possivelmente auxilia a explicar por que os cânceres tendem a aparecer em alguns tecidos e em outros não?

10.12 Sinopse e perspectivas

Quando Bárbara McClintock descreveu, primeiramente, telômeros nas extremidades de cromossomos de milho, ela não poderia ter antecipado a surpreendente convergência de sua descoberta com os modelos moleculares da patogênese do câncer. Agora sabemos que os telômeros são os principais determinantes da capacidade das células de multiplicar a um número limitado de ciclos de crescimento e divisão antes de parar a proliferação e entrar no estado que chamamos crise. Esse potencial proliferativo limitado de células humanas normais parece atuar como uma importante barreira ao desenvolvimento de cânceres por meio da limitada proliferação de clones de células pré-neoplásicas.

Esse modelo mecanístico de imortalização celular e patogênese de câncer é interessante, embora somente por ser tão simples. Ainda, a simplicidade desse modelo não deveria obscurecer o fato de que muito da estrutura e função de telômeros permanece pouco entendido, e algumas das conclusões descritas neste capítulo podem necessitar de uma substancial revisão um dia.

Barra lateral 10.10 O colapso de telômero pode contribuir para o câncer em órgãos afetados por inflamação crônica No Capítulo 11, leremos sobre vários tumores humanos que surgem em tecidos que sofrem perda contínua de células devido a infecções ou inflamações crônicas. Tal desgaste de células, o qual pode acontecer em um período de décadas, ocorre em tecidos como aqueles afetados por colite ulcerativa, esôfago de Barrett e infecção pelos vírus de hepatite B ou C. Em resposta às perdas de células diferenciadas nos tecidos afetados, as células-tronco desses tecidos estão continuamente produzindo substitutos para assegurar a manutenção das funções teciduais. Essas células-tronco são forçadas a passar por muito mais ciclos de crescimento e divisão do que as células-tronco correspondentes de tecidos normais. Os repetidos ciclos celulares resultantes podem taxar os poderes regenerativos dos grupos de células-tronco e levar, finalmente, ao colapso do telômero, ao desencadeamento de ciclos de quebra-fusão-ponte e à geração de cariótipos que favorecem a proliferação celular neoplásica.

Tal mecanismo pode contar para as altas taxas de câncer observadas em indivíduos que sofrem dessas diversas doenças inflamatórias e infecciosas. De fato, nas células epiteliais intestinais de indivíduos que sofrem de colite ulcerativa, pode-se frequentemente encontrar pontes de anáfase, que são sinais de ciclos BFB e, assim, do colapso de telômero – precisamente o que esperaríamos se o colapso de telômero estivesse contribuindo para o aparecimento dos carcinomas de cólon verificados nesses pacientes (Figura 10.36.). De maneira similar, as pontes de anáfase têm sido documentadas nas células do esôfago de Barrett (Figura 2.13), uma condição na qual o refluxo de ácido do estômago causa uma alta renovação de células epiteliais esofágicas que leva, com uma significativa frequência, a carcinomas de esôfago.

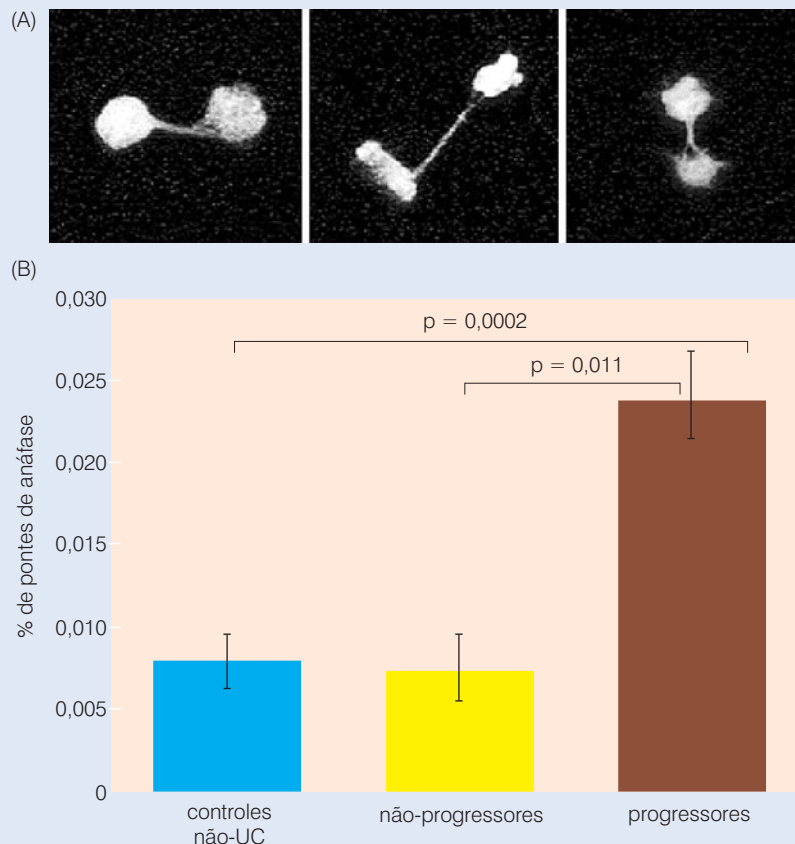


Figura 10.36 Colite ulcerativa e pontes de anáfase A colite ulcerativa (UC) envolve a irritação crônica e a inflamação do epitélio do cólon. Essas provocam uma renovação de células epiteliais do cólon que pode permanecer com o passar de várias décadas. Tal condição leva, com uma significativa frequência, ao desenvolvimento de carcinomas de cólon. (A) Pacientes com UC podem ser separados em “progredores”, nos quais a colite leva ao aparecimento de um ou mais carcinomas, e “não-progredores”, os quais não demonstram evidências de tumores intestinais. Dentre as células epiteliais de cólon de progredores, as pontes de anáfase características de ciclos BFB são frequentes (veja também as Figuras 10.14 e 10.15). Em adição, suas células epiteliais de cólon exibem um extenso encurtamento de telômeros e numerosas aberrações cariotípicas (*não-mostrado*). (B) Amostras de tecido de cólon de indivíduos normais e de não-progredores UC mostram relativamente poucas pontes de anáfase, enquanto números muito maiores são encontrados no epitélio inflamado de progredores. Isso indica uma correlação entre a ocorrência de pontes de anáfase e o início do desenvolvimento de tumor. Os valores p indicam a probabilidade de essas medidas diferirem por acaso. (De J. N. O’Sullivan, M. P. Bronner, T. A. Brentnall et al., *Nat. Genet.* 32: 280-284, 2002.)

Dentre os muitos assuntos não-resolvidos, estão as conexões entre as descobertas descritas neste capítulo e um outro problema de pesquisa bioquímica: o envelhecimento do organismo, que ocorre em humanos e outros mamíferos de vida longa, atribuível ao progressivo desgaste do telômero, à resultante perda de capacidade de células em continuar a proliferação em certos tecidos e, por fim, à depleção de populações celulares, é necessário para a manutenção da integridade tecidual e funcional? Enquanto atraente em conceito, existem seguramente mecanismos alternativos de envelhecimento que precisamos considerar. Por exemplo, as células em tecidos em processo de envelhecimento podem perder sua força devido a uma variedade de insultos químicos e genéticos acumulados que elas sofrem em muitas décadas, e essa progressiva perda de viabilidade pode não ter nada a ver com o encurtamento de telôme-

ro. Mesclada com essas questões está uma outra: o encurtamento de telômero relacionado à idade contribui para as taxas bastante aumentadas de câncer na velhice (Barra lateral 10.11)?

Muito do nosso entendimento de como a proliferação celular é controlada tem sido influenciado por observações de células propagadas *in vitro*. Experimentos de cultura celular nos mostram que a grande maioria de tipos celulares humanos normais em cultura, mais cedo ou mais tarde, pára a proliferação e entra em um estado viável, embora sem crescimento, chamado senescência. As células que de alguma forma enganam a senescência são capazes de proliferar por um período limitado antes de entrar em crise, em que o estágio de colapso de telômero desencadeia mudanças cromossômicas devastadoras.

A senescência permanece sendo uma questão bastante debatida em biologia de câncer, já que existem indicações de que vários tipos celulares não passam por esse processo em virtude da presença de telômeros desgastados nas extremidades de seus cromossomos. Em vez disso, o estresse fisiológico trouxe condições subótimas de cultura que representam as principais causas desencadeantes. Essas observações levam à questão, ainda sem resposta definitiva, se processos comparáveis à senescência replicativa afetam as células dentro de tecidos vivos. Além disso, os mecanismos bioquímicos básicos que governam a senescência celular continuam a ser descobertos (Barra lateral 10.12), indicando que nosso entendimento deste estado celular sofrerá consideráveis revisões nos anos que estão por vir.

O colapso de telômeros durante a crise representa uma “faca de dois gumes” do ponto de vista da progressão de câncer. Por um lado, esse colapso, e a crise que é provocada, parece representar uma maneira eficiente para o corpo limitar o crescimento de clones de célu-

Barra lateral 10.11 Os telômeros encurtados contribuem para as aumentadas taxas de câncer entre os idosos? A incidência de muitos tipos de tumores humanos aumenta dramaticamente com a idade. As razões precisas para essa dependência da incidência de câncer pela idade são complexas, e provavelmente incluem danos acumulados ao genoma, declínios na função imune relacionados à idade e o fato de que a progressão de tumor é um processo de múltiplas etapas estendido que frequentemente leva muitas décadas. O encurtamento progressivo de telômero também pode contribuir. Os dados de medidas como aquelas apresentadas na Figura 10.37 rendem três conclusões: (1) em alguns (e talvez na maioria) tecidos humanos, os

telômeros encurtam progressivamente com a idade. (2) A taxa de encurtamento difere em tecidos diferentes, aparentemente em virtude da diferença de atividade mitótica nas linhagens celulares que estão sendo estudadas. (3) A dispersão em cada curva indica a substancial variabilidade interindividual nos tamanhos de DNA telomérico no início da vida e/ou as taxas de encurtamento de telômero durante o tempo de vida. (Além disso, não discutido aqui, sabe-se que os DNAs teloméricos nas extremidades de diversos braços cromossômicos dentro de uma célula exibem tamanhos cromossomo-específicos diferentes e que estes variam de um indivíduo para outro.)

Os telômeros que são desgastados abaixo de um tamanho mínimo não são mais capazes de proteger as extremidades de DNA cromossomal. Em algumas células, tais telômeros criticamente encurtados podem limitar os subseqüentes poderes proliferativos de uma linhagem celular, atuando, desse modo, de uma maneira antineoplásica. Ao mesmo tempo, telômeros criticamente curtos podem estimular fusões extremidade-extremidade de cromátides, e estas, por sua vez, podem desencadear ciclos de quebra-fusão-ponte que podem contribuir para a instabilidade cariotípica e o desenvolvimento de câncer. O colapso de telômero, então, pode ser um importante fator nas taxas aumentadas de incidência de câncer dos idosos – uma noção que ainda necessita ser testada experimentalmente.

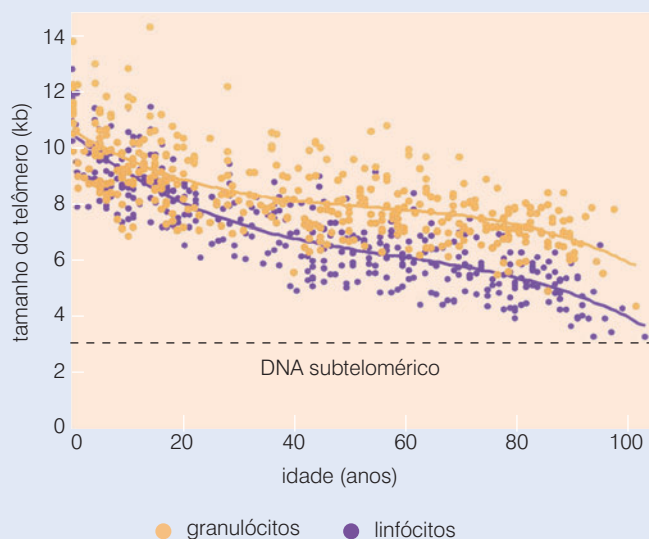


Figura 10.37 Encurtamento de telômero, idade e câncer Os tamanhos de DNA telomérico foram medidos em linfócitos e granulócitos de 400 indivíduos. Como é evidente, o tamanho dos telômeros diminuiu progressivamente em ambos os tipos celulares com o aumento da idade. A imprecisão na medida dos tamanhos de telômeros é de $\pm 0,5$ kb. A linha horizontal (tracejada) representa o nível mínimo com o qual o DNA telomérico não protege mais as extremidades cromossômicas. (Cortesia de G. M. Baerlocher e P. Lansdorp.)

Barra lateral 10.12 A senescência celular é contagiosa? As descrições de senescência celular apresentadas neste capítulo mostraram esse estado como um processo celular autônomo, no qual mecanismos de sinalização intracelular desencadeiam a entrada neste e o mantém uma vez que ele tenha sido estabelecido. Entretanto, um teste experimental para genes celulares que são responsáveis pela manutenção da senescência fez surgir um suspeito improvável – o gene que codifica o inibidor 1 do ativador de plasminogênio (*PAI-1*).

O ativador de plasminogênio é uma protease extracelular que converte plasminogênio em plasmina; esta última, também uma protease, atua para clivar uma variedade de substratos no espaço extracelular. Dentre esses substratos, estão os precursores inativos de fatores de crescimento, os quais se tornam mitógenos ativos e fatores de sobrevivência após a clivagem mediada pela plasmina. *PAI-1* pode bloquear a ativação da plasmina e, desse modo, prevenir a ativação do fator de crescimento no espaço extracelular.

O gene *PAI-1* é um dos muitos alvos da ativação transcricional por p53 (Tabela 9.2). Após p53 induzir a transcrição de *PAI-1* e, assim, a proteína ser liberada de uma célula, a ativação proteolítica de fatores de crescimento é bloqueada. Se a ativação de *PAI-1* por p53 é prevenida experimentalmente, então p53 perde suas propriedades de induzir a senescência. Em adição, a expressão ectópica de *PAI-1* causa a senescência de células que estão em um robusto crescimento. Portanto, a expressão de *PAI-1* é tanto necessária quanto suficiente para a senescência celular mediada por p53. Já que *PAI-1*, uma vez liberada por uma célula no espaço extracelular, pode bloquear a ativação de fatores de crescimento por células das proximidades, estas também podem ser induzidas a entrar em senescência. Consequentemente, a senescência pode ser coordenada por agentes extracelulares (p. ex., *PAI-1*) e é, a partir dessa perspectiva, um processo celular não-autônomo.

las neoplásicas. Por outro lado, algumas células podem coexistir com telômeros em colapso se suas respostas ao DNA danificado forem defectivas (p. ex., por causa da perda da função de p53). Os múltiplos ciclos de quebra-fusão-ponte (BFB) resultantes podem criar genótipos alterados (Figura 10.38) que favorecem fortemente a proliferação maligna. A subsequente aquisição de atividade de telomerase pode então capacitar tais células geneticamente alteradas a tirarem vantagens de seus genótipos aberrantes por meio da entrada em uma fase de crescimento altamente agressiva que resulta, mais cedo ou mais tarde, em tumores malignos.

As ações da própria telomerase também são totalmente contraditórias. Já que a expressão de hTERT em células humanas normais confere uma substancial atividade enzimática, essas células parecem conter todos os componentes necessários da holoenzima telomerase, salvo a subunidade catalítica hTERT. Uma vez expressa, hTERT parece guarnecer as células com uma função completa de telomerase e contribuir para a subsequente imortalização delas. Essa capacidade proliferativa reforçada tem sido de grande interesse para gerontologistas, que enfrentam muitas dificuldades com relação à prevenção do envelhecimento e a restauração de tecidos fortes em idosos. Como mencionado anteriormente, alguns acreditam que o colapso de telômero é a causa do envelhecimento. Tais pesquisadores especulam hTERT como uma solução óbvia para os poderes proliferativos debilitados de tecidos sob envelhecimento. Porém, aqui, a “faca de dois gumes” da ação de telomerase se torna evidente. Suplementando tecidos envelhecidos com telomerase, pode-se imortalizar inadvertidamente clones de células pré-malignas que estão indubitavelmente espalhados sobre esses tecidos e, assim, contribuir para o aparecimento de tumores que de outro modo nunca se formariam.

A mais direta e convincente prova da importância de telômeros e da telomerase na patogênese do câncer vem de experimentos que serão descritos em detalhe no próximo capítulo: descobriu-se que um clone de gene *hTERT* é um ingrediente essencial no coquetel de genes introduzidos que são utilizados experimentalmente para transformar células humanas normais em derivativos tumorogênicos. Sem a presença de *hTERT*, a transformação de célula humana falha. (Protocolos alternativos para a transformação de células humanas chegam ao mesmo ponto final por meio da introdução de genes, como *myc*, que induzem a expressão do gene *hTERT* endógeno das células.)

O papel central da telomerase em abastecer o crescimento de células cancerosas sugere um novo modo de terapia anticâncer. Inibidores de telomerase deveriam provar ser potentes em matar células cancerosas que carregam telômeros relativamente curtos – situação observada em muitas células tumorais humanas telomerase-positivas. Tais drogas, se desenvolvidas, deveriam, ao mesmo tempo, ter pouco ou nenhum efeito em células normais por todo o corpo – que expressam níveis relativamente baixos de telomerase – e, assim, somente transitoriamente durante a fase S.

Enquanto atraente em conceito, esse plano pode ser sabotado por certas realidades. Primeiro, programas de pesquisa executados por um número de companhias farmacêuticas designadas para desenvolver novos inibidores da função de hTERT têm falhado repetidamente em alcançar moléculas potentes e altamente específicas. As razões para essas falhas são desconhecidas. Segundo, ninguém sabe se os níveis relativamente baixos da enzima telomerase detectável em certos tipos de células normais pelo corpo humano exercem um papel significativo na capacidade proliferativa e na viabilidade dessas células. Consequentemente, os efeitos colaterais de drogas antitelomerase desses agentes, que deveriam ser desenvolvidos, são imprevisíveis.

Em contrariedade a essas dificuldades iniciais, a enzima hTERT permanece um alvo atraente para o desenvolvimento de drogas. Em virtude de sua atividade ser essencial para a grande maioria de cânceres humanos, drogas antitelomerase provavelmente apresentam grande utilidade no tratamento de diversos tipos de tumores. Certamente, se tal desenvolvimento de droga for realizado, essa pesquisa, a qual iniciou com a genética de milho e com os peculiares ciclos de vida de ciliados, um dia contribuirá significativamente para a conquista da doença neoplásica. Para o momento, o que fica é nada além que um fundo de vontade.

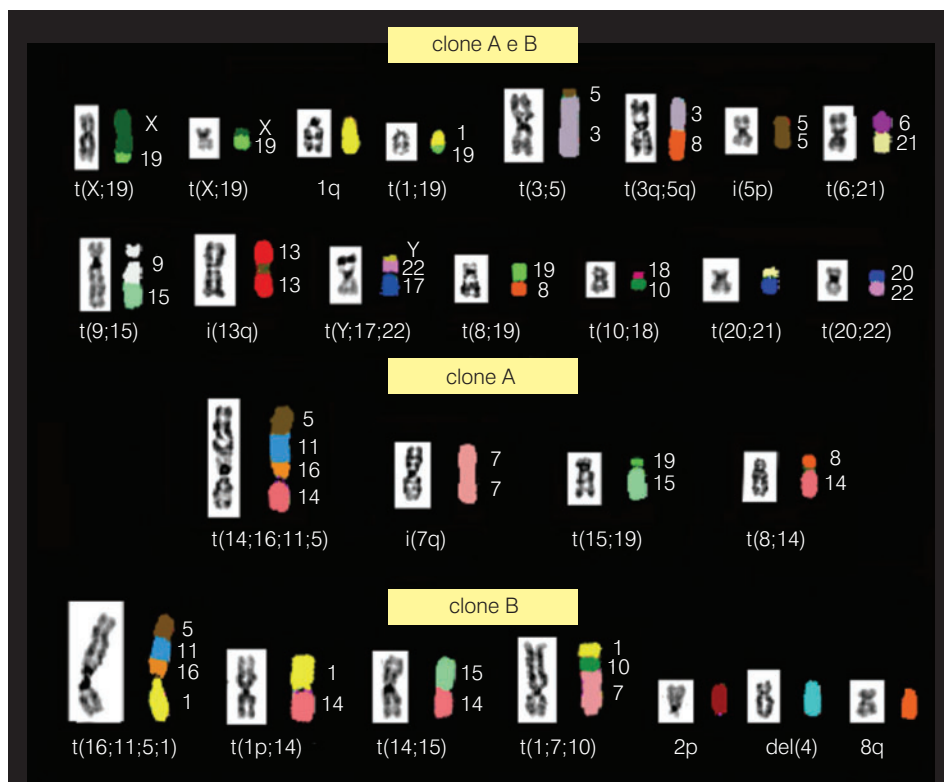


Figura 10.38 Caos cariotípico O cariótipo de células cancerosas pode ser revelado pelo uso da técnica de SKY para “pintar” cada cromossomo com sua própria cor característica. Um grande número de cromossomos participa de translocações nas células que fazem parte dos dois subclones (A e B) de uma linhagem celular humana de carcinoma de bexiga. Isso é indicado pelo fato de que muitos cromossomos carregam segmentos originários de dois cromossomos humanos normais e alguns carregam segmentos derivados de quatro cromossomos humanos normais distintos. Cada translocação é indicada por um “t” seguido pelos números dos cromossomos parentais dos quais esses braços derivaram. Um “i” indica um isocromossomo, no qual um único braço de um cromossomo foi duplicado. As letras “p” e “q” indicam os braços curto e longo de cromossomos humanos normais, respectivamente. A palavra “del” indica que um segmento cromossomal normalmente presente foi eliminado. “Clone A e B” indica cromossomos aberrantes compartilhados pelos dois subclones, enquanto “Clone A” e “Clone B” indicam cromossomos que estão presentes unicamente em um ou outro desses subclones. O fato de que os dois subclones diferem um do outro em seus cariótipos indica a instabilidade cromossomal que sofrem enquanto estão em cultura. Graus comparáveis de aneuploidia podem ser observados em células cancerosas que recentemente foram introduzidas em cultura. (De H. M. Padilla-Nash, W. G. Nash, G. M. Padilla et al., *Genes Chromossomes Cancer* 25: 53-59, 1999.)

Conceitos-chave

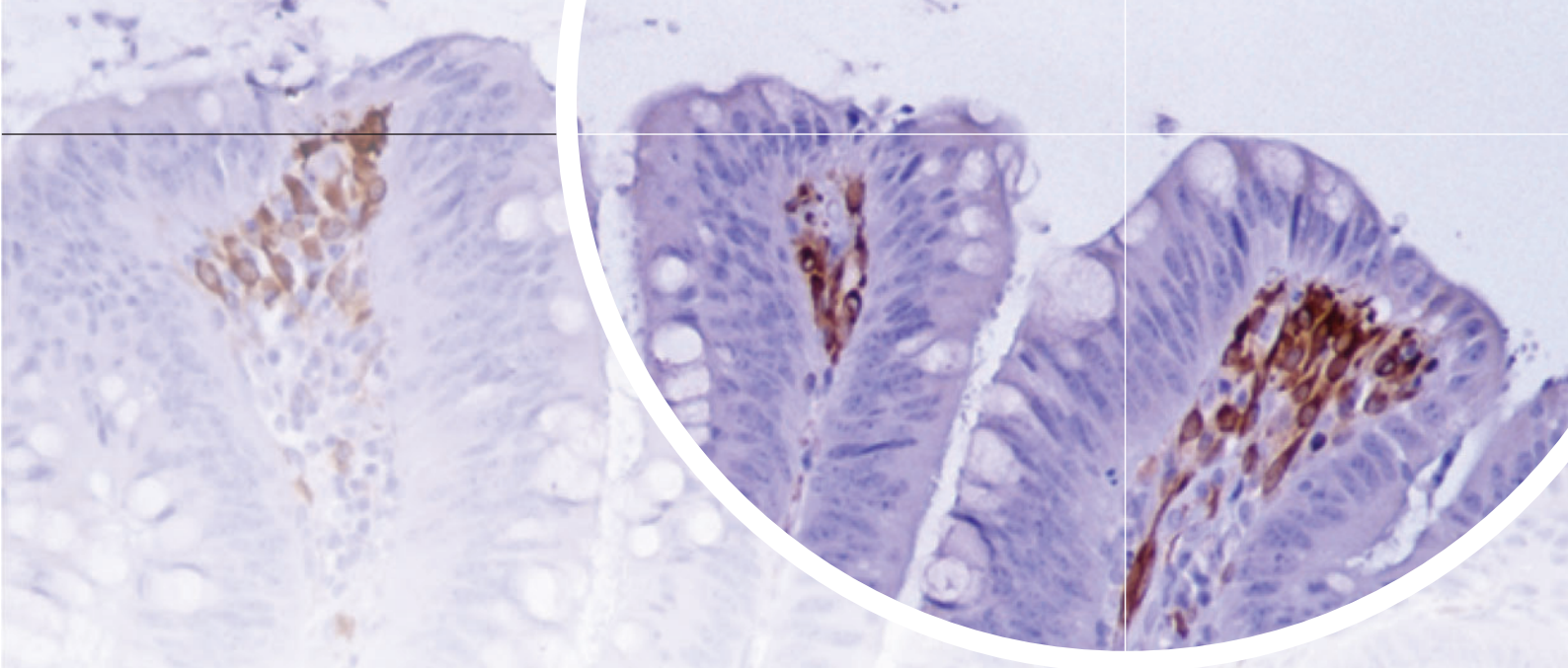
- Duas barreiras previnem células cultivadas de replicar indefinidamente em cultura – a senescência e a crise.
- A senescência envolve a residência, a longo prazo, de células em estado de não-crescimento, porém viável; a crise envolve a morte apoptótica de células.
- A senescência é provocada pelo estresse fisiológico que as células passam *in vitro*, porém seu papel na delimitação da proliferação celular *in vivo* permanece a ser demonstrado.
- A crise é provocada pela erosão dos telômeros, que resulta em amplas fusões cromossômicas de extremidade a extremidade, caos cariotípico e morte celular.
- A maioria das células pré-malignas escapa da crise por meio da ativação da expressão de hTERT, a enzima telomerase, que é especializada em alongar o DNA telomérico estendendo-o em incrementos de hexanucleotídeos.
- Algumas células cancerosas escapam da crise por meio da regeneração de seu DNA telomérico pelo mecanismo ALT.
- Células que estabilizaram seus telômeros por meio das ações da telomerase ou mecanismo ALT podem proliferar indefinidamente e são, desse modo, ditas imortalizadas.
- A imortalização celular é um passo que parece governar o desenvolvimento de todos os cânceres humanos.
- As fusões cromossômicas de extremidade a extremidade que acompanham a crise levam a repetidos ciclos de quebra-fusão-ponte, que parecem, por sua vez, ser responsáveis por muito da aneuploidia associada aos cariótipos de muitos tipos de tumores sólidos humanos.

Questões elaboradas

1. Quais as vantagens que os ciclos de quebra-fusão-ponte conferem a populações em desenvolvimento de células pré-malignas?
2. Por que a aquisição de um potencial proliferativo imortalizado é tão importante para tumores humanos?
3. Quais os tipos de evidências que conectam os telômeros e a telomerase à entrada em um estado de crescimento senescente?
4. Quais complicações e efeitos colaterais podem resultar da inativação da atividade de telomerase (ainda hipotética) por drogas anticâncer que são inibidores específicos dessa enzima?
5. Como a configuração molecular da alça T protege as extremidades de DNA telomérico?
6. Como a molécula de RNA de *hTR* associada à telomerase facilita a manutenção de DNA telomérico pela enzima hTERT?

Leitura adicional

- Aisner DL, Wright WE & Shay JW (2002) Telomerase regulation: not just flipping the switch. *Curr Opin. Genet. Dev.* 12, 80–85.
- Artandi SE & DePinho RA (2000) Mice without telomerase: what can they teach us about human cancer? *Nat. Med.* 6, 852–855.
- Bérubé NG, Smith JR & Pereira-Smith OM (1998) Insights from model systems: the genetics of cellular senescence. *Am. J. Hum. Genet.* 62, 1015–1019.
- Blasco MA (2002) Telomerase beyond telomeres. *Nat. Rev. Cancer* 2, 627–633.
- Blasco MA (2005) Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nat. Rev. Genet.* 6, 611–622.
- Blasco MA & Hahn WC (2003) Evolving views of telomerase and cancer. *Trends Cell Biol.* 13, 389–394.
- Campisi J (2005) Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. *Cell* 120, 513–522.
- Cong Y-S, Wright WE & Shay JW (2002) Human telomerase and its regulation. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66, 407–425.
- Cristofalo VJ, Lorenzini A, Allen RG et al. (2004) Replicative senescence: a critical review. *Mech. Ageing Dev.* 125, 827–848.
- de Lange T. (2004) T-loops and the origins of telomeres. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 323–329.
- DePinho RA (2000) The age of cancer. *Nature* 408, 248–254.
- Hanahan D (2000) Cancer: benefits of bad telomeres. *Nature* 406, 573–574.
- Harrington L (2004) Those dam-aged telomeres! *Curr. Opin. Genet. Dev.* 14, 22–28.
- Hayflick L & Moorhead PS (1961) The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* 25, 585–621.
- Lundblad V (2001) Genome instability: McClintock revisited. *Curr Biol.* 11, R957–R960.
- Mathon NF & Lloyd A (2001) Cell senescence and cancer. *Nat. Rev. Cancer* 1, 203–213.
- Neumann AA & Reddel RR (2002) Telomere maintenance and cancer—look, no telomerase. *Nat. Rev. Cancer* 2, 879–884.
- Shay JW & Wright WE (2000) Hayflick, his limit, and cellular ageing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1, 72–76.
- Shay JW, Zou Y, Hiyama E & Wright WE (2001) Telomerase and cancer. *Hum. Mol. Genet.* 10, 677–685.
- Stewart SA & Weinberg RA (2000) Telomerase and human tumorigenesis. *Semin. Cancer Biol.* 10, 399–406.



CAPÍTULO 11

Tumorogênese de Múltiplas Etapas

“Na sobrevivência de indivíduos e raças favorecidas, durante a permanente luta da renovação da existência é que percebemos a forma e o imensurável poder da seleção natural.”

Charles Darwin, biólogo, 1859

A formação de um tumor é um processo complexo e freqüentemente se estende por décadas. Células consideradas normais evoluem para células com fenótipos denominados neoplásicos por um processo chamado de **progressão tumoral**. Esse processo ocorre em muitos locais no corpo humano normal, avançando cada vez mais na medida em que envelhecemos. Raramente esse processo se desenvolve em apenas um único local para tornar-nos cientes do seu produto final, uma massa tumoral clinicamente detectável.

A progressão tumoral é dirigida por uma seqüência de mutações que ocorrem aleatoriamente e alterações epigenéticas do DNA que afetam os genes que controlam a proliferação, a sobrevivência celular e outras características associadas ao fenótipo celular maligno. A complexidade desse fenômeno reflete os processos evolutivos os quais selecionam várias barreiras entre células normais e suas derivadas altamente neoplásicas. Conseqüentemente, o final de cada etapa necessária para a formação de um tumor pode ser visto como uma ramificação de uma outra barreira que impediu o progresso de um clone de células pré-malignas.

Vários estudos apontam que essas barreiras são obras de processos evolucionários relativamente recentes. Podemos imaginar que primeiro as forças evolucionárias trabalharam para desenvolver a arquitetura e fisiologia de metazoários complexos e, posteriormente, procederam em consertar esses planos com o objetivo de reduzir o risco de câncer.

Entretanto, um cenário alternativo é mais provável: o risco de ocorrer a multiplicação de células não-controladas tem sido um companheiro constante de metazoários desde os primórdios, há cerca de 650 milhões de anos. Com a permissão para que células individuais dentro de seus tecidos proliferassem, até mesmo metazoários simples correram o risco de

uma ou outra das suas células constituintes se tornarem renegadas e, com isso, desencadearem a multiplicação celular desordenada que chamamos de câncer. Consequentemente, a construção de defesas contra o câncer deve ter acompanhado a evolução da complexidade dos organismos.

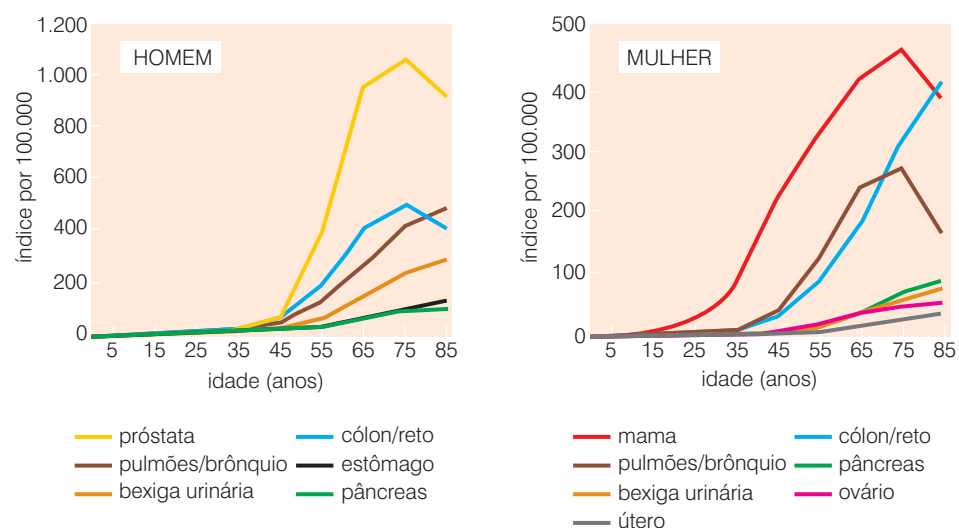
Nos capítulos anteriores, acompanhamos mecanismos individuais em sistemas de controles celulares que deverão ser neutralizados para o início da tumorogênese. Neste capítulo, tentaremos analisar tais mecanismos em um contexto coletivo e examinar como alterações nesse sistema poderão originar, como produto final, a formação de um tumor primário. Iniciaremos tentando entender a problemática central do câncer: quantas alterações sequenciais diferentes são necessárias nas células e tecidos para originar um câncer humano?

11.1 A maioria dos cânceres humanos se desenvolve ao longo de várias décadas

Estudos epidemiológicos mostram que a idade é um fator primordial para a incidência de câncer. Nos Estados Unidos, a probabilidade de morte por câncer de cólon é mais de mil vezes maior em indivíduos de 70 anos de idade do que em indivíduos jovens, com idade de 10 anos. Esse fato, por si só, sugere que esse tipo de câncer e, por extensão, outros cânceres comuns em indivíduos adultos (Figura 11.1), requerem anos, senão décadas, para se desenvolverem. O diagnóstico e tratamento tardio em muitos cânceres possui importantes implicações na saúde pública: a cura do câncer terá um efeito relativamente pequeno sobre a expectativa de vida (Barra lateral 11.1).

O aparecimento de câncer em idades avançadas indica que o desenvolvimento dessa doença requer um extenso período. Um grande exemplo desse efeito tardio de aparecimento pode ser observado na correlação de incidência de câncer de pulmão em homens nos Estados Unidos. O uso de cigarros não era popular nesse grupo até a Segunda Guerra Mundial, quando o hábito de fumar foi popularizado pelos soldados que recebiam cigarro como parte de sua ração alimentar pelas forças armadas durante a Segunda Guerra. Após 30 anos, em meados da década de 1970, a taxa de câncer de pulmão começou a subir em escala surpreendente (Figura 11.2). Ao mesmo tempo o tabagismo espalhou-se pelo mundo e atingiu o pico, em 1990, levando a estimativas de que a mortalidade global por câncer de pulmão, que atualmente excede a 1,1 milhão de mortes por ano, atingirá seu pico somente em alguma década depois de 2020. Nas outras áreas do mundo fora dos Estados Unidos, essa janela de tempo de aproximadamente 35 anos entre o aumento marcante do tabagismo e os grandes números de casos de câncer de pulmão também pode ser aplicada.

Figura 11.1 Incidência de câncer em várias idades Este gráfico de diagnóstico de vários tipos de cânceres epiteliais mostra o aumento da incidência de forma inclinada conforme o aumento da idade, indicando que o processo de formação de tumores geralmente requer décadas para atingir sua forma completa. (Cortesia de W.K. Hong, compilado de *SEER Cancer Statistics Review*.)



Barra lateral 11.1 Uma vida livre de câncer não levaria a mudanças extremas na longevidade As curvas de incidência de câncer em função da idade ilustradas na Figura 11.1 levaram a uma conclusão surpreendente e ao mesmo tempo desanimadora. Mesmo que as mortes associadas ao câncer sejam tão frequentes nas populações do ocidente, sendo responsáveis por cerca de 20% da mortalidade total, a cura de todas as formas de câncer estenderia a perspectiva de vida por apenas poucos anos. Um cálculo sobre as mortes relacionadas ao

câncer ocorridas na Holanda em 1990 indicou que, se todas as mortes relacionadas ao câncer fossem eliminadas, isso geraria uma extensão de 3,83 anos a mais na expectativa de vida para homens e 3,38 anos para mulheres. (Em países menos industrializados, onde doenças causadas por infecções diminuem a meia-vida populacional, os efeitos na expectativa de vida seriam ainda menores).

Como a grande maioria dos cânceres surge tarde na vida, a prevenção ou cura dessa doença tardia terá um efeito relativamente pequeno no

tempo de vida de um indivíduo que já viveu cerca de oito décadas ou mais. De forma contrária, mesmo que a mortalidade infantil seja muito baixa no ocidente, reduções adicionais na morte prematura causada por várias condições terá efeitos quantitativos profundos no aumento da expectativa de vida como um todo. No meio, entre essas duas fontes de mortalidade, existem as doenças como as doenças cardíacas, que frequentemente matam indivíduos uma década ou mais antes de contraírem câncer.

Várias fórmulas matemáticas que prevêm a frequência de vários cânceres em função da idade foram desenvolvidas por epidemiologistas de todo o mundo. Elas evidenciam que, dependendo do tipo de câncer manifestado, a **incidência** da doença (a taxa na qual a doença é diagnosticada) e as taxas de mortalidade ocorrem como função de a^4 até a^7 , em que a representa a idade do paciente no diagnóstico inicial. Para cânceres epiteliais, na maioria dos casos, o risco de morte por câncer aumenta cerca de 5 a 6 vezes dependendo da idade do indivíduo (Figura 11.3). As funções algébricas podem ser interpretadas facilmente. Caso a probabilidade de um efeito seja indicada por a^n , isso sugere que $n + 1$ eventos independentes, cada um ocorrendo aleatoriamente e com probabilidade comparável por unidade de tempo, devem ocorrer antes que o resultado final – nesse caso, um tumor diagnosticado – seja obtido. O fato de que a incidência de uma doença como o câncer de cólon começa a emergir somente na sétima ou oitava década de vida indica que cada um desses eventos ocorre com uma baixa probabilidade a cada ano. Mais especificamente, cada evento provavelmente ocorre em uma média uma vez a cada 10 a 15 anos, e o total sucesso dos eventos pode normalmente requerer 40 a 60 anos para se completar.

Esses cálculos dão a idéia de que a formação de um tumor é altamente complexa. De fato, alguns eventos críticos poderão ocorrer mais rapidamente do que outros. Por isso que os cálculos de cinética de progressão de tumores refletem a influência de taxas consideradas limitantes para a progressão do tumor, mas que ocorrem lentamente. Os eventos rápidos não são registrados nesses cálculos. Por essa razão, os números de eventos que são necessários para a formação de um tumor são bem mais altos do que aqueles preditos pelas fórmulas do tipo a^n .

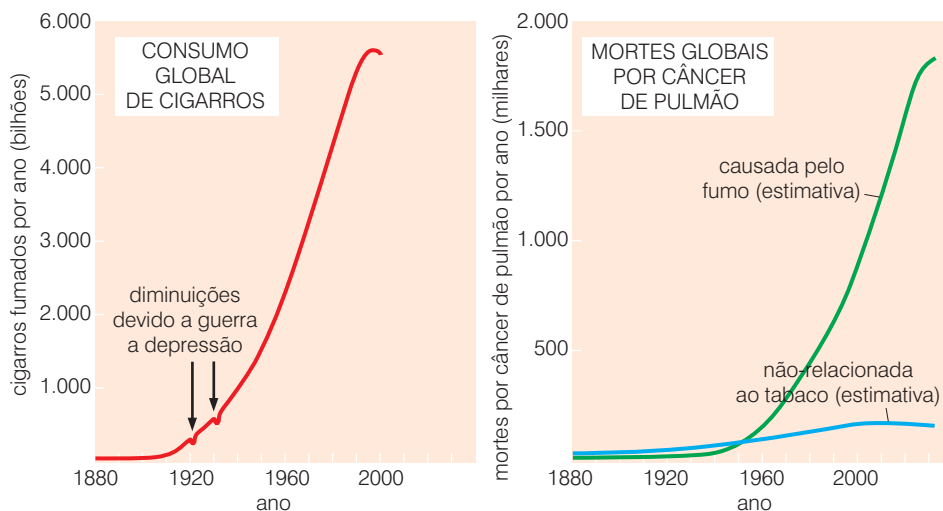
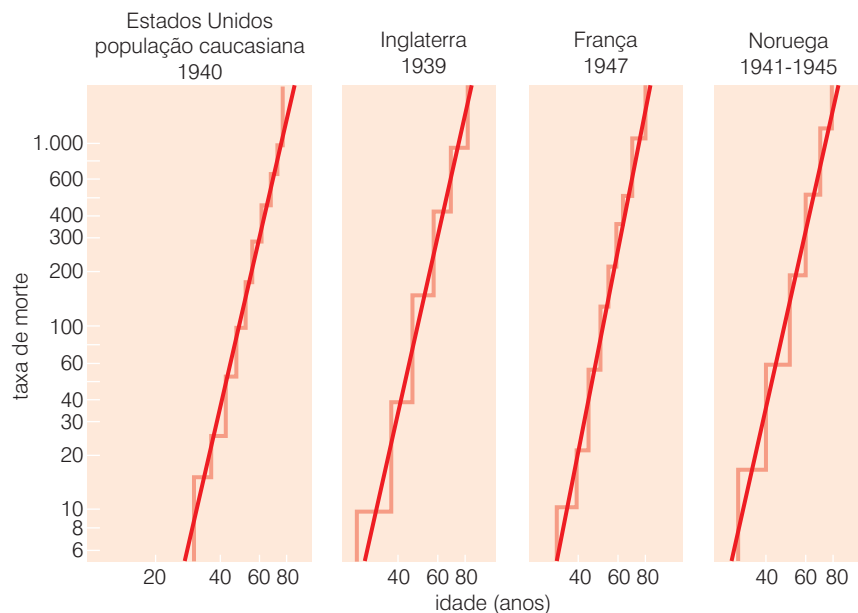


Figura 11.2 Consumo de cigarro e câncer de pulmão Esta curva compara o consumo anual global de cigarros (bilhões fumados por ano, curva vermelha, painel da esquerda) com dados reais e preditos de mortalidade mundial por câncer de pulmão (milhares de mortes por ano; curvas verde e azul, painel direito). Estima-se que a mortalidade anual por câncer de pulmão induzido por tabaco tenha seu pico em algum momento na quarta ou quinta década do século XXI. Durante o século XX, houve um aumento de câncer de pulmão não relacionado com tabaco (curva azul). O número preciso desses casos não é muito claro, e existem debates sobre quantos deles são atribuídos ao tabagismo passivo. (De R.N. Proctor, *Nat. Rev. Cancer* 1:82-86, 2001.)

Figura 11.3 Idade de morte por vários tipos de cânceres epiteliais Os gráficos indicam a mortalidade geral de câncer de 1939 a 1947 em quatro países cujos índices levantados pela saúde pública são extremamente confiáveis. Estes gráficos em escalas log-log para a taxa de morte por câncer em homens (mortes por populações de 100 mil, *ordenada*) em diferentes idades (*abscissa*) apresentam uma curva que indica que são necessários de 5 a 6 eventos limitantes para a produção de um câncer letal. Por exemplo, a inclinação de 5 indica pelo menos seis eventos limitantes, cuja natureza não é revelada por essa análise. Interessantemente, essas inclinações são bastante similares nos diferentes países apresentados. As inclinações diferem levemente de acordo com os diferentes tipos de câncer (*não-mostrado*). (De A.G. Knudson, *Nat. Rev. Cancer* 1:157-162, 2001, reproduzido a partir de C.E. Nordling, *Brit. J. Cancer* 6:68-72, 1953.)



A partir da cinética de progressão de um tumor, podemos concluir com bastante certeza que a tumorogênese é um complexo processo de múltiplas etapas. Ela mostra que essa cinética de múltiplas etapas complica os cálculos para as taxas reais com as quais os cânceres atingem populações humanas (Barra lateral 11.2).

A conclusão de que a tumorogênese é um processo de múltiplas etapas sugere outra idéia interessante: assuma que (1) uma seqüência de eventos não-conhecidos é necessária para um tumor aparecer e (2) muitos desses eventos ocorrem com frequências comparáveis em todos nós. Ao mesmo tempo, tais suposições indicam que, na medida em que envelhecemos, todos nós carregaremos populações de células, nos diversos tecidos, que completaram algumas, mas não todas, as etapas da progressão tumoral. Uma vez que muitos de nós não viveremos tempo suficiente para completar todos os eventos necessários que finalizam o aparecimento do câncer (pois morreremos por outra causa que não o câncer), nunca saberemos que alguma dessas progressões tumorais foi iniciada em nosso corpo. Seguindo esse ponto de vista, o aparecimento de câncer é inevitável; se não morrêssemos por alguma outra doença ou causa natural, mais cedo ou mais tarde, seríamos vítimas do câncer.

É claro que, alguns de nós – não muitos – poderemos contrair uma doença neoplásica, como o câncer de cólon. Isso sugere algo mais: enquanto a expressão a^5 ou a^6 pode prever a média de incidência de câncer de cólon em uma larga amostra populacional, a probabilidade de os

Barra lateral 11.2 Tumorogênese de múltiplas etapas complica a epidemiologia do câncer O cálculo das verdadeiras taxas de incidência de câncer ou das taxas de morte por esses cânceres em várias populações humanas é um exercício dificilmente simples e direto. Por exemplo, a apresentação da incidência de câncer de cólon em diferentes populações como o número de casos diagnosticados por centenas de milhares de pessoas por ano é insignificante, uma vez que algumas populações podem conter um número desproporcional de pessoas jovens, enquanto outras podem ter mais indivíduos mais velhos. Esta última população terá, é claro, números muito maiores de cânceres de cólon por unidade de população total.

A forte dependência da idade na incidência de basicamente todos os cânceres força os epidemiologistas a calcular a *incidência de câncer*

ajustada pela idade, o que corrige o fato de que as distribuições pela idade de diferentes populações humanas diferem muito. O cálculo de uma incidência ajustada pela idade pode nos dizer, por exemplo, qual é a probabilidade de uma mulher de 60 anos nos Estados Unidos contrair câncer de mama ao longo de um ano comparada com o risco de mulheres da mesma idade que vivem no Egito, Cazaquistão ou Portugal. Ao mesmo tempo, os índices de incidência ajustada pela idade permitem fazer comparações significativas de uma população específica durante um extenso período de tempo – por exemplo, o risco de câncer de cólon da população de 1930 nos Estados Unidos comparado com aquele de uma população sucessora de 1990, em que os efeitos das diferenças na distribuição da idade das duas populações são mais uma vez eliminados.

eventos patogênicos importantes ocorrerem por unidade de tempo varia muito de um indivíduo para o outro, sendo afetada por predisposição hereditária, dieta, estilo de vida e muitas outras variáveis que são conhecidas por influenciar demasiadamente o aparecimento do câncer de cólon em várias populações humanas.

Dados epidemiológicos chamam a atenção para vários outros discernimentos importantes sobre a natureza de múltiplas etapas da tumorigênese. Se analisarmos a frequência de mesotelioma em humanos (causado largamente por exposição a asbestos e tabaco) e câncer de pele em camundongos (induzidos pela administração repetida na pele de benzo[*a*]pireno), torna-se aparente que a formação de cada um desses tumores necessita de um período extenso de exposição contínua a carcinógenos e de que é a *duração* dessa exposição (em vez da *idade* absoluta dos indivíduos expostos ou da idade de quando a exposição iniciou) que determina o momento do início da doença detectável (Figura 11.4). Nesses casos, tumores são criados pela ação de carcinógenos exógenos, e não pelo aparecimento espontâneo no corpo; estes carcinógenos aumentam a taxa de progressão tumoral, freqüentemente em muitas ordens de magnitude acima das taxas dos espontâneos. Além disso, a patogênese de cada um desses tumores parece envolver uma programação de exposição pré-determinada antes da formação de um tumor.

11.2 Histopatologia proporciona evidências da formação de tumor em múltiplas etapas

Os histopatologistas são peritos na arte de examinar tecidos normais e doentes sob o microscópio e, no caso de câncer, são capazes de elaborar diagnósticos sobre o tecido de origem do tumor bem como seu estágio de desenvolvimento. Como já discutimos brevemente na Seção 2.4, análises histopatológicas têm garantido amplo suporte para a discussão da origem de vários tumores ocasionados por uma sequência determinada de eventos complexos. Revisaremos essas análises com riquezas de detalhes por serem esses os pontos principais deste capítulo.

A noção de desenvolvimento de tumor humano por processos de múltiplas etapas tem sido documentada mais claramente no epitélio intestinal. As células do epitélio intestinal que estão dispostas no interior da cavidade (lúmen) do trato gastrointestinal, formam uma camada de fileira única de células em vários locais (Figura 11.5). Essas populações de células epiteliais

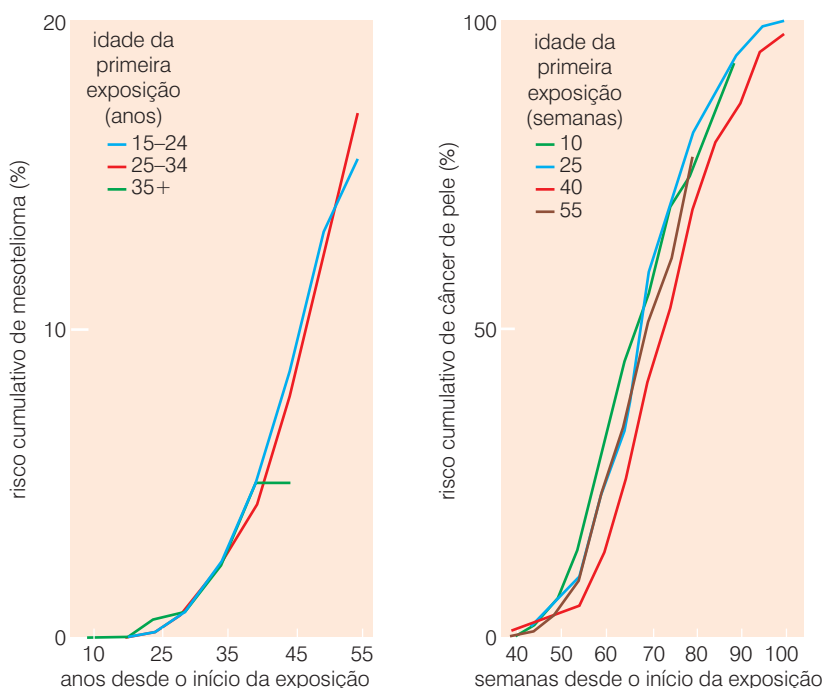
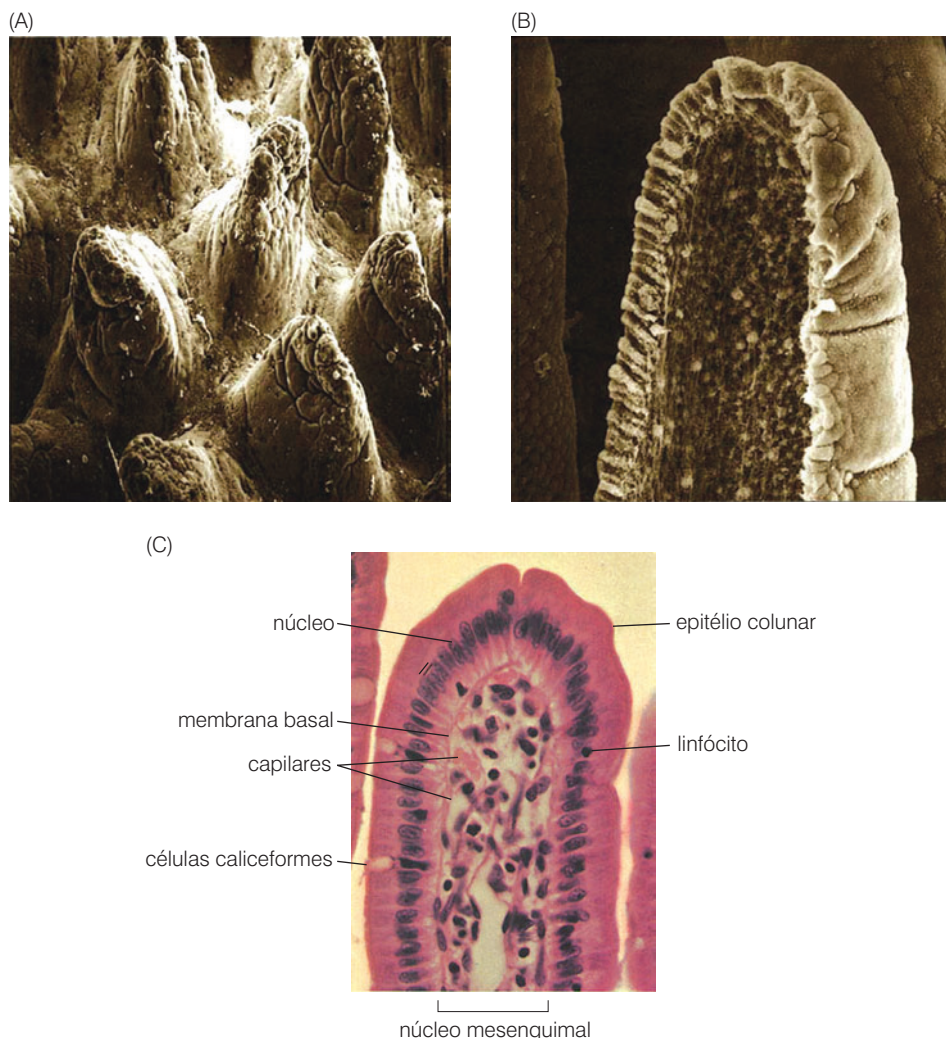


Figura 11.4 Incidência de câncer e a exposição a carcinógenos Os dois gráficos indicam que a exposição cumulativa a estímulos carcinogênicos, em vez da idade na qual essa exposição iniciou, determina a probabilidade de desenvolver um tumor detectável. O gráfico da esquerda mostra o risco cumulativo de desenvolvimento do mesotelioma (um tumor do revestimento mesodérmico de órgãos abdominais e pulmões) entre trabalhadores de isolamento nos Estados Unidos, muito desses expostos a asbestos. O gráfico da direita apresenta o risco cumulativo de desenvolvimento de câncer de pele em camundongos tratados experimentalmente com protocolos de indução de carcinoma de pele. (De J. Peto, *Nature* 411:390-395, 2001.)

Figura 11.5 Microanatomia da parede intestinal normal (A) Micrografia eletrônica de varredura do epitélio intestinal (neste caso, do intestino delgado) mostrando vilos (dedos) da mucosa intestinal que se estendem para o lúmen em intervalos regulares. (B) Cada viló é recoberto por uma camada de células epiteliais (as quais são separadas do centro pela membrana basal). (C) O centro de cada viló, que é separado do epitélio de revestimento por uma membrana basal, é composto por vários tipos de células mesenquimais, incluindo fibroblastos, células endoteliais, pericitos e várias células do sistema imune (*não-indicadas*). (A e B, de S. Canan; C, do Hospital Virtual da Universidade de Iowa, Atlas of Microscopic Anatomy, Prancha 194).



possuem um número alto de renovação. A cada minuto, 20 a 50 milhões de células no duodeno humano e um décimo destas no cólon morrem, e um número igual de células novas as substitui!

Subjacente a esse epitélio está a membrana basal (lâmina basal), à qual tais células estão ancoradas. A membrana basal, como em outros tecidos epiteliais, forma parte da matriz extracelular e é formada por proteínas secretadas tanto por células epiteliais acima como por células do estroma abaixo da membrana (veja a Figura 2.3). As células mesenquimais que compõem o estroma são em sua grande maioria fibroblastos, mas outros tipos de células, incluindo células endoteliais, que formam as paredes de capilares e vasos linfáticos, e células do sistema imune, como macrófagos e mastócitos, também estão dispersas. Abaixo dessa camada de células estromais na parede intestinal encontramos uma delgada camada de músculo liso responsável pela movimentação do conteúdo do lúmen por movimentos de contrações peristálticas.

A camada de células epiteliais constitui o sítio de maiores alterações **patológicas** (i. e., associadas a doenças) associadas ao desenvolvimento de carcinoma de cólon. Análises de biópsias de cólon humano revelaram um tecido em vários estados, com graus de anormalidade que variam de um tecido levemente alterado, que é dificilmente distinguível da estrutura da **mucosa** intestinal normal (o revestimento do lúmen do cólon), até a desordem caótica das células que formam o tecido altamente maligno (Figura 11.6A). Da mesma forma que o revestimento do intestino normal, esses crescimentos são compostos por uma variedade de tipos celulares distintos, inclusive alguns tipos de células encontradas em tecidos normais.

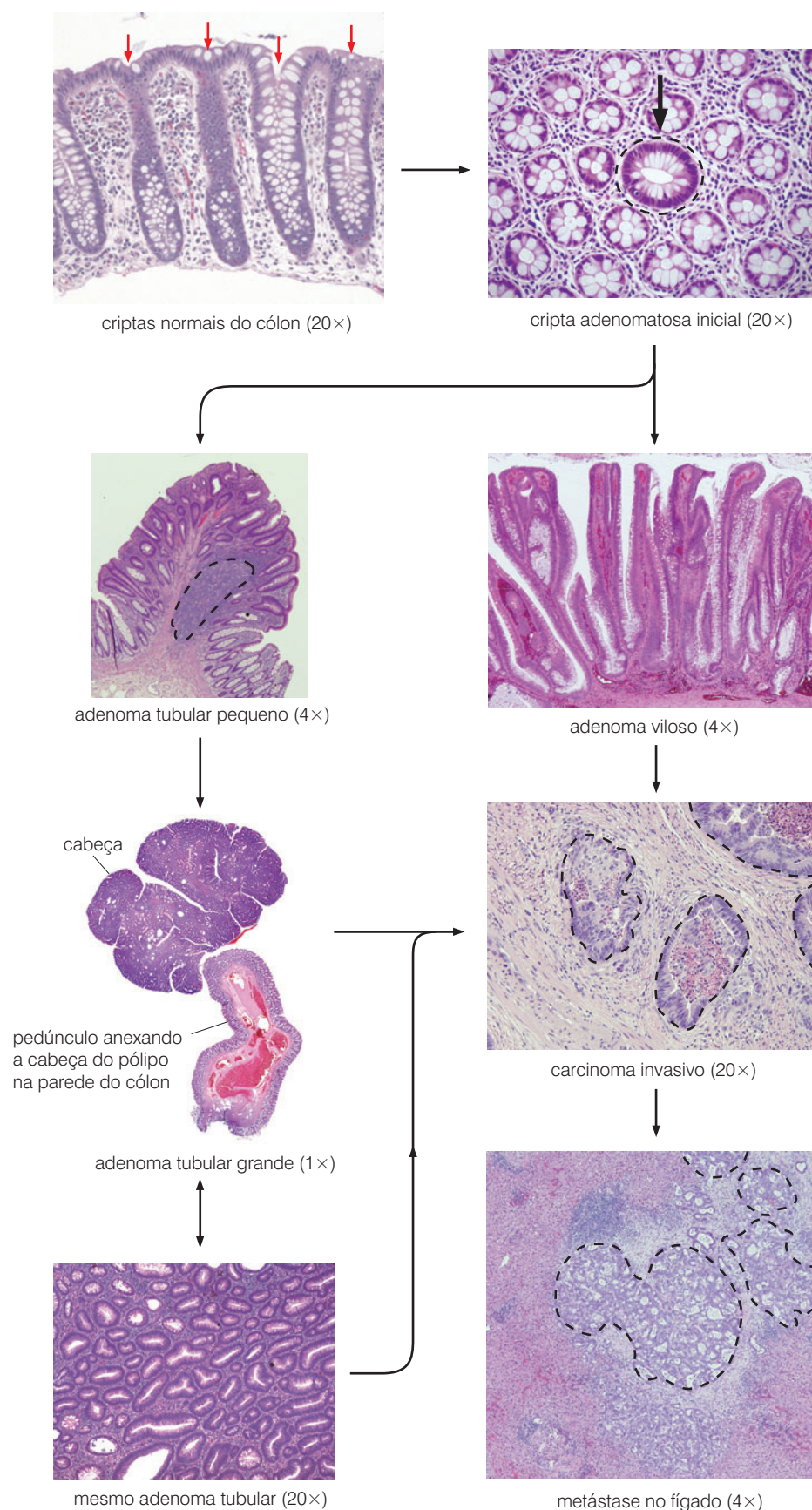


Figura 11.6 Alterações histopatológicas do cólon humano. Vários tipos de tecidos anormais revelados por análises histopatológicas do cólon humano podem ser arranjados em ordem crescente de anormalidade. De fato, sucessões mais detalhadas podem ser esboçadas, uma vez que adenomas podem ser subdivididos em vários subtipos. As criptas normais do cólon podem ser vistas aqui em um corte longitudinal (*à esquerda, no topo*). Uma pequena cripta adenomatosa (*seta, circulada*) é mostrada, juntamente com criptas normais, em um corte transversal (*topo, à direita*). Os limites de um pequeno adenoma tubular estão circundados (*esquerda, meio*). Um grande adenoma tubular (*abaixo*) pode às vezes ser chamado de *pedunculado*, indicando sua inserção, via um pedúnculo, na parede do cólon. O carcinoma de invasão local é visto aqui como pequenas ilhas de células de carcinoma (*circulado*) circundadas por estroma (*direita, figura do meio inferior*). Metástases para o fígado (*circulo*) são circundadas por camadas de células estromais recrutadas; o tecido hepático normal pode ser visto *à esquerda*. A progressão histopatológica, indicada aqui esquematicamente, pareceria ser a via mais lógica pela qual o tecido normal, neste caso o epitélio do cólon, é transformado, por meio de uma série de passos intermediários, em carcinomas e, por fim, em crescimentos metastáticos. Entretanto a evidência para a maioria dessas relações de produtos precursores é na verdade bastante fragmentada. (Cortesia de C. Iacobuzio-Donahue e B. Vogelstein.)

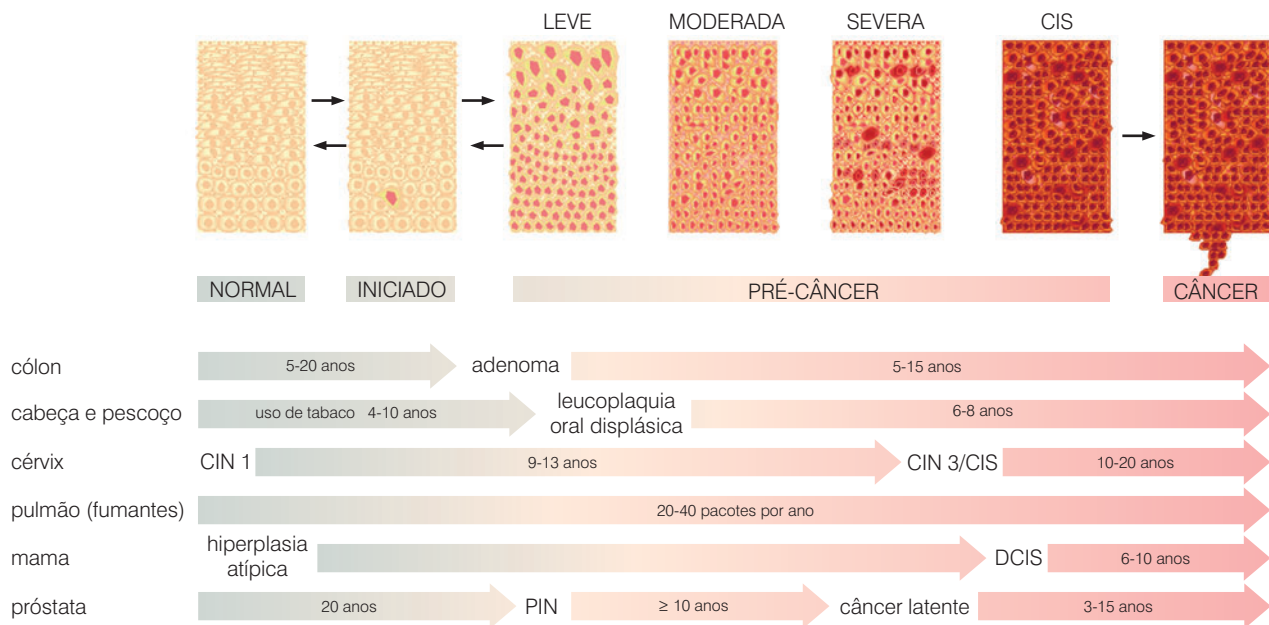


Figura 11.7 Tumorogênese de múltiplas etapas em diferentes locais do organismo. Acredita-se que a patogênese dos carcinomas possa ser controlada por mecanismos biológicos muito similares nos vários tecidos epiteliais encontrados em um organismo. Conseqüentemente, tem sido proposto que a tumorogênese de múltiplas etapas envolvendo entidades histológicas similares progride ao longo de vias paralelas nesses vários locais do organismo. Essas similaridades são obscuras devido às diferentes nomenclaturas utilizadas de um tecido para outro. CIS = carcinoma *in situ*; CIN = neoplasia cervical intra-epitelial; DCIS = carcinoma ductal *in situ*; PIN = neoplasia prostática intra-epitelial. (Cortesia de W.K. Hong.)

Alguns crescimentos que são classificados como *hiperplásicos* exibem histologia quase normal, uma vez que as células individuais dentro deles têm uma aparência normal. Entretanto, está claro que nas áreas de hiperplasia a taxa de divisão celular é bastante alta, gerando um epitélio mais delgado do que o normal. Ainda outros crescimentos apresentam histologias anormais, com as células epiteliais não mais formando uma camada celular bem-ordenada da mucosa normal do cólon e a morfologia das células individuais desviando de forma sutil das células normais; tais crescimentos são ditos *displásicos* (veja a Figura 2.14). Um crescimento muito maior e mais desviado que tem células displásicas e um engrossamento marcado é chamado de *pólipo* ou *adenoma* (veja as Figuras 2.15 e 2.16). São encontrados vários tipos distintos de pólipos no cólon intestinal; alguns estão ligados à parede do cólon, enquanto outros são ligados à parede do cólon por uma base. É importante salientar que todos esses crescimentos são considerados benignos, pois não conseguem atravessar a membrana basal e atingir o tecido estromal subjacente.

Os crescimentos anormais que conseguem quebrar a membrana basal e dirigir-se a outros tecidos são considerados malignos. Existem distinções entre esses carcinomas de cólon mais agressivos e células cancerosas associadas, dependendo se elas penetraram profundamente nas camadas do estroma e do músculo liso ou se elas migraram – metastatizaram – para locais anatomicamente distantes no organismo, onde elas podem ter sucesso na formação de novas colônias de células tumorais.

Tendo arranjado esses crescimentos em uma sucessão de fenótipos de tecidos que avançam do normal para o agressivamente maligno (veja a Figura 11.6), podemos imaginar que tal sucessão descreve com alguma precisão o curso do desenvolvimento tumoral no cólon humano. Na verdade, a evidência que dá suporte a esse esquema é bastante indireta. Alguns tumores podem se desenvolver por meio de uma série de crescimentos intermediários, a maioria dos quais está arranjada neste capítulo. Alternativamente, é possível que alguns tipos de tecidos descritos como intermediários nessa seqüência representem finais mortais em vez de etapas para tumores mais avançados. Em casos de câncer de cólon, é também possível que o desenvolvimento do tumor dependa da habilidade dos crescimentos iniciais de pular sobre etapas intermediárias, permitindo que alcancem finais altamente malignos de forma muito mais rápida do que a sugerida pela sucessão. Sucessões similares têm sido propostas para uma variedade de outros cânceres epiteliais (Figura 11.7).

Ao menos três tipos de evidências suportam fortemente a relação precursor-produto entre adenomas de cólon e carcinomas. Primeiro, em ocasiões raras, podemos observar um carci-

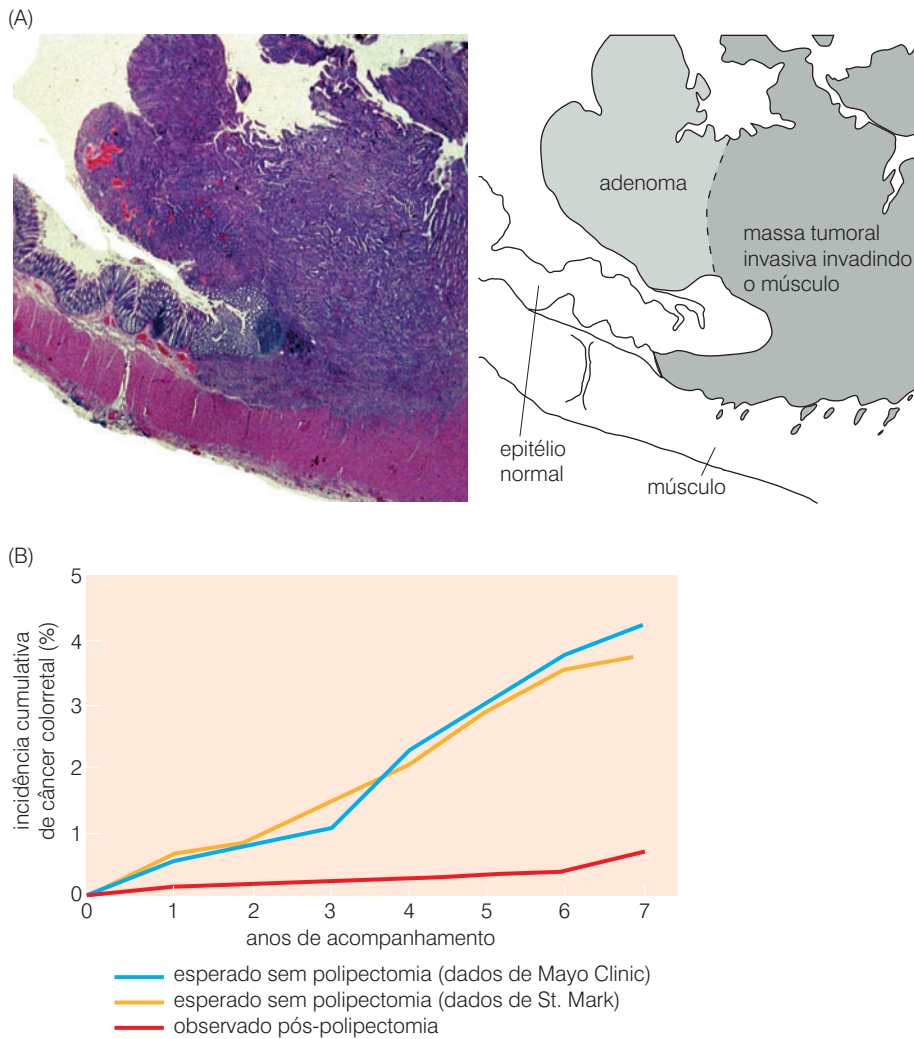


Figura 11.8 Evidências da progressão de adenoma para carcinoma. As evidências das relações precursor-produto entre adenomas e carcinomas intestinais vêm da observação de no mínimo dois tipos de casos clínicos. (A) Na ocasião, observou-se carcinomas crescendo diretamente a partir de adenomas. Como vemos aqui, a demarcação entre os dois pode ser esboçada com precisão. (B) Uma segunda linha de evidência deriva de estudos clínicos em que a colonoscopia é utilizada para rastrear grandes grupos de pacientes. Quaisquer pólipos que são descobertos são removidos por *polipectomia* (remoção cirúrgica de pólipos). Assim, no gráfico ao lado, dois estudos independentes (*linhas amarelo-laranja e azul*) predizem um certo número esperado de carcinomas em tais grupos com base na experiência histológica. Entretanto, em pacientes que passaram por polipectomia, os números observados de câncer colorretal diagnosticado nos anos subseqüentes reduziram em mais de 80% (*linha vermelha*). (A, cortesia de Paul Edwards; B, cortesia de W.K. Hong, dados de S. Winawer, A. G. Zauber, M.N. Ho et al., *N. Engl. J. Med* 329:1977-1981, 1993.)

noma crescendo diretamente a partir de um pólipo adenomatoso (Figura 11.8A). Podemos desconfiar que crescimentos como esses ocorram rotineiramente durante o desenvolvimento de virtualmente todos os carcinomas de cólon e que a rápida expansão do carcinoma logo destrói o adenoma do qual ele se originou.

Segundo, estudos clínicos foram realizados em um grande grupo de pacientes que foram submetidos a colonoscopia, uma técnica frequentemente utilizada para examinar o cólon por pólipos adenomatosos e remover qualquer um que seja detectado. Nesses estudos, os pacientes cujos pólipos eram removidos tiveram, nos anos subseqüentes, uma redução de aproximadamente 80% na incidência de carcinomas de cólon (Figura 11.8B). Isso indica que, nessa população de pacientes, no mínimo 80% dos carcinomas de cólon derivaram de adenomas preexistentes e detectáveis, pois a colonoscopia pode ter omitido alguns pólipos; a proporção real pode ser mais alta. (Tais observações ainda não provam que cada carcinoma de cólon único que se forme nos humanos deva surgir a partir de um adenoma preexistente).

A terceira evidência que sustenta a evolução de adenoma para carcinoma vem da doença chamada polipose adenomatosa familiar (FAP; Seção 7.11), na qual indivíduos que herdam uma forma mutante do gene *APC* supressor de tumor são suscetíveis a desenvolver de dúzias a mais de mil pólipos no intestino (Figura 7.22). Com frequências baixas, mas muito bem detectadas, alguns desses pólipos progredirão espontaneamente para um carcinoma. Isso explica o alto risco de câncer de cólon em tais indivíduos.

O desenvolvimento de carcinomas em outros órgãos do corpo pode assemelhar-se, ao menos no esboço, à progressão em múltiplas etapas observada no cólon (veja, por exemplo, a Figura 11.7). Muitos desses outros tecidos, como a mama, o estômago, os pulmões, a próstata e o pâncreas, também exibem crescimentos que podem ser chamados de hiperplásico, displásico e adenomatoso, e tais crescimentos poderiam ser os precursores benignos dos carcinomas que surgem nesses órgãos. Entretanto, a evidência histopatológica que poderia suportar a progressão de múltiplas etapas de tumores nesses tecidos não é tão bem-desenvolvida como a do cólon – uma consequência do acesso ao cólon pela colonoscopia e à inacessibilidade a esses outros tecidos. Nos casos de tecidos não-epiteliais, incluindo componentes do sistema nervoso, o tecido conjuntivo e o sistema hematopoiético, a evidência histopatológica que comprova a progressão tumoral de múltiplas etapas é ainda mais incompleta.

De fato, a histopatologia alterada de crescimentos pré-maligno e maligno reflete as mudanças que ocorreram em um subconjunto de células que compõem cada uma dessas massas. No exemplo de carcinomas, a alteração progressiva de células epiteliais dirige sistematicamente o processo de progressão do tumor e as mudanças associadas nas histopatologias. Os outros tipos de células encontrados nesses tumores, especificamente aqueles no estroma, podem ser descritos como inocentes – células normais que foram recrutadas à massa tumoral e anexadas por células epiteliais anormais para colaborar no processo de formação do tumor. Mas como veremos no Capítulo 13, o papel dessas células aparentemente normais na formação do tumor é muito mais complexo e interessante.

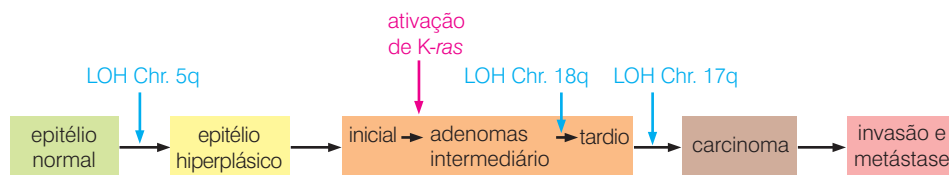
11.3 Os crescimentos no cólon acumulam alterações genéticas ao longo da progressão do tumor

As forças que dirigem a progressão do tumor em vários tecidos não são esclarecidas nas descrições histopatológicas como aquelas apresentadas nos itens anteriores. É possível que alterações epigenéticas contribuam para as mudanças progressivas no fenótipo de células e tecidos enquanto um tumor se desenvolve. Por exemplo, algumas das etapas na progressão do tumor puderam recapitular as mudanças específicas no comportamento de células que ocorrem normalmente durante a embriogênese. Sabemos que virtualmente todas as etapas do desenvolvimento embrionário dependem das mudanças nos programas de expressão gênica, e não de alterações no próprio genoma. (A clonagem da ovelha Dolly mostrou que o genoma de uma célula epitelial altamente especializada é idêntico àquele de um óvulo recém-fertilizado.)

De acordo com um modelo alternativo, muitas das etapas de progressão tumoral são dirigidas por alterações genéticas acumuladas nos genomas de células tumorais em desenvolvimento. Esse segundo cenário é fundamentado por evidências extensivas armazenadas durante várias décadas passadas, as quais documentaram o acúmulo de números aumentados de genes mutantes em células à medida que elas evoluíram de um estado de crescimento mais benigno para um mais maligno. Discutimos muitos desses genes mutantes em capítulos anteriores.

Esse paralelo entre evolução genética e progressão celular fenotípica é bem-estudado em carcinomas de cólon humano. Existem muitos dados na literatura sobre a base genética da progressão de tumor de cólon devido à alta acessibilidade por meio da técnica de colonoscopia, como já comentado, e também devido à alta incidência desse tipo de câncer na população ocidental, o que facilitou a coleta e estudo de um grande número de amostras pré-malignas e malignas em vários centros, como a escola médica de Johns Hopkins, em Baltimore, Maryland, cujos interesses foram focalizados em compreender esses tumores e suas origens genéticas.

Esses pesquisadores reconheceram a evidência extensiva de que os alelos mutantes de genes como *ras* e *p53* podem contribuir para a transformação celular sob condições *in vitro*. Assim, eles procuraram determinar uma correlação *in vivo* pela análise de genomas de grupos de



pequenos adenomas de cólon, de pequeno, médio e grande porte. Era plausível que à medida que tecidos do cólon avançavam progressivamente de normais para altamente malignos, as células epiteliais nesses vários tecidos acumulariam números cada vez maiores de mutações em vários genes.

Foi isso que esses cientistas descobriram no final dos anos 1980. Os genes por eles examinados incluíam o oncogene *K-ras* e outros genes supressores de tumor. Na verdade, as identidades dos genes supressores de tumor que participam da patogênese do câncer de cólon não eram conhecidas quando eles começaram o seu trabalho, assim eles procuraram por regiões cromossômicas que sofreram a perda da heterozigiosidade (LOH) durante a progressão do tumor. É preciso salientar que uma taxa elevada de LOH em uma região cromossômica particular fornece a indicação forte de que tal região abriga um gene supressor de tumor e de que células cancerosas em desenvolvimento exploram o mecanismo de LOH como meios de substituir ou silenciar os alelos ainda intactos (i. e., tipo selvagem) de tal gene supressor de tumor (Seção 7.4).

Além disso, essa pesquisa descobriu que os adenomas em estágios iniciais frequentemente apresentavam perda de heterozigiosidade no braço longo do Cromossomo 5 (i. e., 5q). Quase a metade de adenomas de médio porte apresentou um mutante do oncogene *K-ras*. Até mesmo adenomas maiores tenderam a apresentar altas taxas de LOH no braço longo do Cromossomo 18 (i. e., 18q), e cerca da metade de todos os carcinomas apresentaram um LOH no braço curto do Cromossomo 17 (i. e., 17p; Figura 11.9; veja também a Figura 7.14).

Essas observações corroboraram fortemente a idéia de que células epiteliais podem adquirir fenótipos cada vez mais neoplásicos durante o curso da progressão tumoral, seu genoma mostra um aumento correspondente no número de locos genéticos alterados. Igualmente importante, essas mudanças envolvem a ativação de um proto-oncogene em um oncogene (*K-ras*) e a inativação aparente de pelo menos três genes supressores de tumor distintos. Essa foi a primeira sugestão de um fenômeno que agora é reconhecido como sendo bastante comum: o número de genes supressores de tumor inativados excede muito o número de oncogenes ativados presentes nos genomas de células tumorais humanas.

As identidades dos locos genéticos nos Cromossomos 5 e 17 foram reveladas logo depois que essa progressão genética foi apresentada (Figura 11.10). Foi observado que o gene do Cromossomo 5q21, que frequentemente é alvo de LOH, era o gene supressor de tumor *APC* (polipose adenomatosa de cólon) (Seção 7.11), enquanto o gene do Cromossomo 17p13 foi identificado como sendo o gene supressor de tumor *p53* (Capítulo 9). A identidade do gene ou dos genes no Cromossomo 18q que são inativados durante a patogênese do carcinoma de cólon ainda permanece obscura. Enquanto essa região cromossômica sofre a perda de heterozigiosidade em mais de 60% dos cânceres de cólon humano, o melhor candidato para gene de supressão de tumor é *DPC4/MADH4*, que codifica Smad4, uma proteína que libera sinais

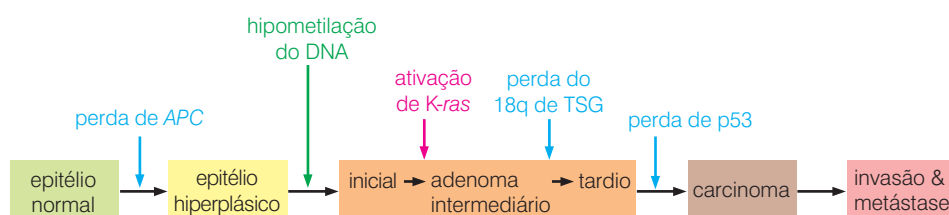


Figura 11.9 Progressão de tumor de cólon e perda da heterozigiosidade em vários braços cromossômicos. Amostras de DNA extraídas de tecidos em vários estágios de progressão de câncer de cólon foram analisadas para averiguar a perda de heterozigiosidade (LOH) por meio do exame de marcadores cromossômicos para braços longos e curtos da maioria dos cromossomos, como descrito na Figura 7.4. Em geral, cada braço cromossômico foi representado por um ou mais locos genéticos que existiam na forma heterozigota nos tecidos normais de um paciente. À medida que a progressão tumoral procedia, as células epiteliais do cólon envolvidas exibiam um aumento no número de braços cromossômicos que perderam a heterozigiosidade. Certas regiões cromossômicas (*letrero azul*) sofreram altas taxas de LOH, sugerindo que elas carregavam genes supressores de tumores que estão sendo inativados, em parte, pelo mecanismo de LOH. (Adaptada de B. Vogelstein, E. R. Fearon, S. E. Kern et al., *Science* 244:207-211, 1989.)

Figura 11.10 Genes supressores de tumores e a progressão de carcinoma de cólon. Cada uma das regiões cromossômicas que sofrem perda da heterozigiosidade (LOH; Figura 11.9) foi considerada positiva para a presença de gene supressor de tumor (TSG) cuja perda fornece vantagens de crescimento para o desenvolvimento de células epiteliais pré-neoplásicas. Finalmente, dois TSGs foram identificados (*letrero azul*) – *APC* no Cromossomo 5q e *p53* no Cromossomo 17p. A identidade de TSG ou TSGs inativados no Cromossomo 18q ainda não está clara. Além disso, como indicado aqui, foi observado que cerca de metade dos carcinomas de cólon adquiriram mutantes – alelos ativados do gene *K-ras* (*letrero rosa*) –, e que os genomas da maioria dos crescimentos neoplásicos sofrem hipometilação (perda de CpGs metilados; *letrero verde*). A precisa contribuição da metilação para a progressão de tumor ainda não é clara; algumas evidências sugerem que ela gera instabilidade cromossômica.

inibidores de crescimento a partir do receptor TGF- β para o núcleo celular (Seção 6.12). Entretanto, as cópias de *DPC4/MADH4* estão presentes na forma mutante em menos de 15% dos cânceres de cólon, e um segundo gene próximo que codifica para Smad2 é inativado com menor frequência ainda. Isso deixa sem resposta a identidade do(s) gene(s) supressor(es) de tumor no Cromossomo 18q que são alvos de inativação e LOH na maioria desses cânceres.

O caminho mais coerente para analisar as etapas de desenvolvimento do câncer de cólon envolve uma sucessão ordenada de mudanças genéticas que golpeiam com frequência o genoma de células epiteliais do cólon durante a progressão do câncer para o estado maligno, como pode ser visto na Figura 11.10. Na realidade, as seqüências específicas das mudanças genéticas descritas nesta figura apresentam parte do mecanismo de uma porção muito reduzida de todos os tumores de cólon humano. Esse número pode ser calculado a partir das taxas conhecidas de alterações genéticas ou regiões cromossômicas que sabidamente participam da patogênese do câncer de cólon. Enquanto a grande maioria (~ 90%) dos carcinomas do cólon sofre inativação do gene *APC* no Cromossomo 5q em etapas iniciais do processo, apenas cerca de 40 a 50% adquirem uma mutação *K-ras*, de 50 a 70% apresentam um LOH do Cromossomo 17p envolvendo *p53* e cerca de 60% apresentam uma LOH no Cromossomo 18q. Além disso, 12% dos tumores do cólon possuem mutações que conduzem à inativação funcional do receptor TGF- β tipo 2 (Seção 5.7). Uma complicação adicional é criada pela observação de que tumores que carregam oncogenes *K-ras* raramente possuem alelos *p53* mutantes, ou vice-versa.

A maioria de cânceres de cólon deve ter início com uma alteração no Cromossomo 5, mas então tomará vias genéticas alternativas na rota para a malignidade (Figura 11.11A). Essas outras vias envolvem presumivelmente um número comparável de alterações genéticas. Parece plausível, por exemplo, que aqueles carcinomas de cólon que não adquirem um oncogene mutante *K-ras* sustentarão alterações em outros componentes da via de sinalização Ras. Presumivelmente, essas mutações alternativas conferem uma vantagem fisiológica sobre as células do câncer do cólon similar àquela resultante da formação de um oncogene mutante *K-ras* ativado.

Tal suspeita foi levantada após a análise de seqüências de 90 genes distintos de cinase presentes nos genomas de um grupo de 35 carcinomas colorretais. Essas análises indicaram que cerca de 15% desses tumores carregam mutantes, presumivelmente enzimas tirosina cinases ativadas; um outro estudo genético revelou formas mutantes da subunidade de 110 kDa da cinase PI3 (PI3K; Seção 6.6) em aproximadamente um terço dos tumores colorretais analisados. Além disso, outras análises, dessa vez de pólipos de cólon, revelaram que tais crescimentos que não têm os oncogenes *K-ras* ativados frequentemente carregam mutantes, alelos oncogênicos do gene *B-raf*, que codificam para uma serina/treonina cinase (Seção 6.5); significativamente, os oncogenes mutantes *ras* e *raf* são exclusivos, nunca sendo encontrados juntos no mesmo pólipo. Essas várias cinases mutantes são possíveis candidatas a agentes que servem como alternativas funcionais para a oncoproteína *K-ras* durante a progressão do carcinoma de cólon.

É também verdade que as quatro alterações já documentadas pelos investigadores de Johns Hopkins, mesmo quando eles definem a história de um tumor, nem sempre ocorrem na ordem descrita na Figura 11.10. A perda da heterozigiosidade no Cromossomo 5q é quase sempre a primeira na progressão, mas a ordem precisa das mudanças subsequentes pode variar de tumor a tumor. Esse papel único do loco *APC* como o local da primeira etapa genética na patogênese do câncer de cólon parece ser ditado pelos efeitos biológicos únicos da inativação de *APC* (Barra lateral 11.3).

Finalmente, devemos perceber que essas várias mudanças genéticas não limitam um ponto máximo de alterações que contribuem em vias essenciais para a progressão do câncer de cólon. Por exemplo, o tipo de análise genética usada para identificar essa série de quatro regiões cromossômicas registrou apenas aqueles eventos de perda de heterozigiosidade (LOH) em genes supressores de tumor que ocorrem com uma frequência acima da taxa geral de LOH associada a todos os braços cromossômicos em células tumorais avançadas

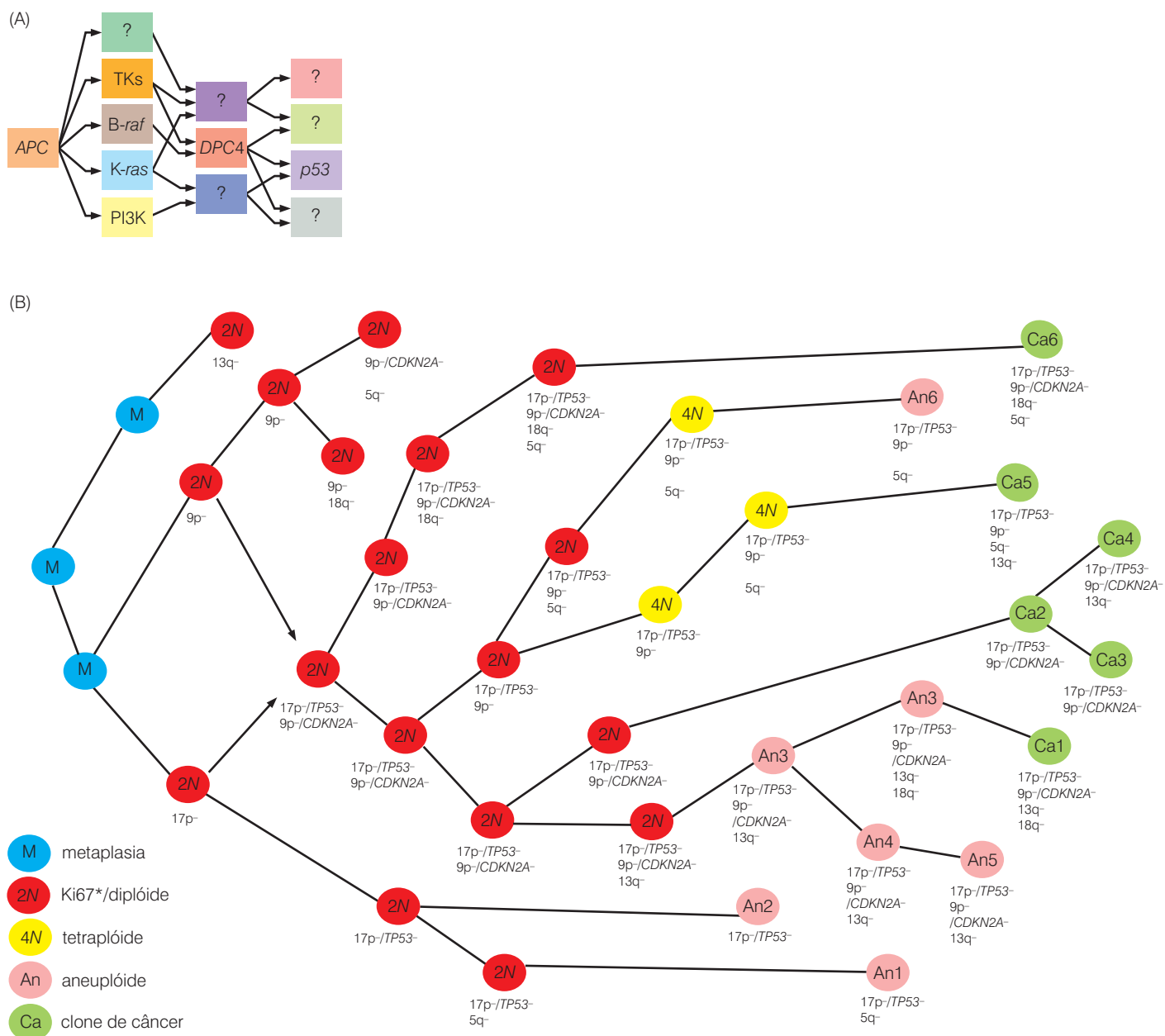


Figura 11.11 Vias genéticas alternativas durante a progressão do câncer (A) A série de alterações genéticas apresentadas na Figura 11.10 não representa a sequência invariável que define as vias genéticas seguidas por todos os carcinomas de cólon. A perda da função APC (ou o ganho equivalente de função da β -catenina) representa o ponto de início que é comum a quase todos os carcinomas de cólon humanos. Entretanto, as identidades dos genes alterados em subseqüentes etapas são variáveis, e a ordem precisa dessas mudanças também pode variar. Isso torna possível, em teoria, as múltiplas vias apresentadas aqui. Além disso, o número exato de passos genéticos que ocorrem durante a patogênese do câncer de cólon humano não é conhecido e pode estar longe dos quatro apresentados aqui. (B) O estudo detalhado do esôfago de Barrett (veja a Figura 2.13), que é uma lesão precursora do carcinoma de esôfago,

leveu à descoberta de várias vias genéticas alternativas apresentadas aqui entre a metaplasia inicial (em que células de origem gástrica deslocam as células escamosas normalmente presentes; *esquerda*), a displasia até os clones de câncer (*direita*) que podem surgir finalmente. Note que as mudanças listadas aqui levam em consideração as mudanças de número cromossômico (incluindo aneuploidia e tetraploidia) bem como a perda de heterosigiosidade (LOH) e a perda aparente da expressão de genes supressores de tumores pela metilação do promotor. Ki67⁺ = positivo para o marcador da fase S de Ki67 e assim em ativa proliferação; CDKN2A⁻ = mutações ou metilação do promotor do gene p16^{INK4A}; TP53⁻ = mutação do gene p53; 9p⁻ = LOH de genes presentes no braço curto do Cromossomo 9, etc.; 2N = diplóide; 4N = tetraplóide. (B, de M.T. Barrett, C.A. Sanchez, L.J. Prevo et al., *Nat. Genet.* 22:106-109, 1999.)

(veja a Figura 7.14). Conseqüentemente, eventos de LOH que ocorrem com baixas frequências em uma coleção de amostras tumorais (i. e., aqueles presentes em 20% ou menos dos tumores analisados) não seriam registrados em tal análise, mesmo que levas-

Barra lateral 11.3 A organização de criptas do cólon explica por que ocorre a perda prematura de APC ao longo da progressão do câncer de cólon. Como descrito anteriormente (Seção 7.11), logo que enterócitos normais do cólon são formados, eles migram para fora da cripta colônica, diferenciam-se e morrem por apoptose dentro de 3 a 4 dias. Consequentemente, a maioria das mutações que atinge os genomas dessas células (p. ex., mutações pontuais que criam o oncogene *K-ras*) será logo perdida pelo organismo por causa da morte rápida dessas células dentro de dias a partir da sua formação inicial. A perda da função de APC, entretanto, resulta no aprisionamento de células dentro das criptas do cólon e assim no acúmulo destas populações de células APC-negativas em tais criptas. (Uma minoria de tumores colorretais expressa uma β -catenina mutante que resiste à degradação, produzindo um estado bioquímico semelhante ao apresentado pela perda de Apc). Como a emigração dos enterócitos para fora da cripta está bloqueada, quando essas células e suas descendentes sustentam mutações adicionais, as células mutantes resultantes também serão retidas nas criptas em vez de serem perdidas rapidamente por emigração e apoptose. Entretanto, não podemos compilar resultados semelhantes para explicar por que as mutações de outros genes envolvidos na progressão do câncer de cólon (*ras*, *p53* e *DPC4/MADH4*) poderiam ocorrer em um determinado momento ou em uma sequência particular durante o curso da progressão de tumor de cólon. Adicionalmente, a sequência de mutação desses outros genes parece ser bastante variável de um tumor de cólon para outro.

sem à eliminação de genes supressores de tumor, importantes funcionalmente, a partir do genoma celular.

Os eventos epigenéticos, incluindo a repressão de alguns genes por meio da metilação do promotor (Seção 7.8) e a desrepressão de outros pela desmetilação, também podem contribuir de forma importante para a progressão de tumores. Recentemente, foram acumuladas várias evidências de que a hipometilação (i. e., desmetilação de sequências que são normalmente metiladas), como observada em adenomas iniciais (veja a Figura 11.10), tem um efeito independente do seu possível efeito na expressão gênica: operando por mecanismos desconhecidos, ela contribui para a instabilidade cromossomal, e o último estado favorece a aceleração da velocidade de progressão tumoral.

A publicação dessa “biografia genética” da tumorogênese do câncer de cólon, como descrito na Figura 11.10, pode ser inferida para uma grande variedade de outros tipos de tumores, cada biografia envolvendo seu grupo particular de oncogenes e genes supressores de tumor. Entretanto, várias descrições (p. ex., dos carcinomas da bexiga, do pâncreas e de esôfago; veja a Figura 11.11B) têm sido relatadas. Isso significa que, no presente, não podemos citar listas de alterações genéticas em genomas de células tumorais para ilustrar a natureza de múltiplas etapas da progressão do câncer na maioria dos órgãos humanos. Com o desenvolvimento de ferramentas mais sofisticadas e mais sensíveis para analisar genomas de células tumorais, as biografias genéticas de vários tipos de tumores devem estar próximas.

11.4 A progressão de múltiplas etapas de tumores ajuda a explicar a polipose familiar e a área de cancerização

A via genética mostrada anteriormente (Figura 11.10) e as suas modificações descrevem os eventos genéticos que ocorrem durante a patogênese de vários dos tumores de cólon esporádicos. Esses tumores surgem no cólon de indivíduos cujos genótipos são, até onde sabemos, geneticamente do tipo selvagem no momento da concepção. Durante o curso do desenvolvimento do tumor de cólon, mutações somáticas (e eventos de metilação) começam a alterar progressivamente os genomas iniciais das células epiteliais do cólon, gerando os genomas corrompidos encontrados em células cancerosas de cólon altamente malignas.

Todos esses fatores podem ser adicionados à noção de que a complexidade dos processos de múltiplas etapas reflete a existência de um jogo igualmente complexo dos mecanismos de defesa que obstruem a ocorrência de tumores em tecidos normais. Cada um desses mecanismos de defesa deve ser enganado ou inativado, um após o outro, para que uma população de células cancerígenas em desenvolvimento possa alcançar estágios finais, tornando-se células malignas.

Dado o vasto número de células epiteliais do cólon que são formadas ao longo da vida ($> 10^{14}$), esses mecanismos de defesa são altamente bem-sucedidos, e carcinomas esporádicos de cólon ocorrem em taxas muito baixas. Além disso, o desenvolvimento de câncer de cólon é virtualmente assegurado em alguns indivíduos, como discutido na Seção 7.11 e anteriormente neste capítulo. Podemos recordar que um alelo mutante da linhagem germinativa do gene supressor de tumor *APC* predispõe um indivíduo ao desenvolvimento de dezenas, centenas e até mesmo milhares de pólipos de cólon – a síndrome da polipose adenomatosa familiar (FAP).

A primeira etapa no desenvolvimento de quase todos os carcinomas *esporádicos* de cólon envolve a inativação do gene *APC* – precisamente, o mesmo gene herdado de forma mutada por indivíduos que sofrem da síndrome da polipose *familiar*. Agora, no contexto da tumorigênese de múltiplas etapas, podemos compreender por que a herança de um alelo *APC* mutante resulta em polipose e câncer de cólon; a primeira etapa na progressão de câncer de cólon, que envolve a inativação de uma cópia do gene *APC*, já ocorreu em todas as células epiteliais do cólon de um indivíduo que sofre de polipose familiar. Isto é, cada uma das suas células, incluindo aquelas no cólon, é *APC*^{+/-} em vez de *APC*^{+/+}.

Desde que a perda da heterozigiosidade é um evento relativamente freqüente por geração celular, centenas, senão milhares, de células epiteliais individuais de cólon podem perder toda a função de APC relativamente cedo na vida de indivíduos que sofrem de polipose familiar, fazendo isso pelo avanço para o estado *APC*^{-/-}. Cada uma destas células negativas para Apc pode gerar, com uma probabilidade significativa, um pólipo adenomatoso; tais pólipos, uma vez formados, têm uma probabilidade significativa (talvez uma em várias centenas) de progredir para um carcinoma. Conseqüentemente, um mecanismo comum de suscetibilidade congênita para o câncer envolve uma aceleração na progressão em múltiplas etapas do tumor, uma vez que uma das suas etapas limitantes críticas não é mais dependente de mutações somáticas que ocorrem com pouca freqüência (pois ela já ocorreu na linhagem germinativa).

Os órgãos afetados por tumores esporádicos desenvolvem múltiplos brotamentos de novos tumores, aparentemente independentes – um fenômeno que é chamado de **área de cancerização**. Esses crescimentos múltiplos parecem assemelhar-se, ao menos superficialmente, a processos de suscetibilidade inata de câncer como o da polipose familiar. De fato, uma única mutação (ou múltiplas) parece ser compartilhada por esses crescimentos múltiplos aparentemente independentes, mas, nesse caso, a alteração genética compartilhada é um produto de um mecanismo de mutação *somática*.

11.5 O desenvolvimento do câncer parece seguir as regras da evolução darwiniana

As observações sobre o câncer de cólon feitas na universidade de Johns Hopkins demonstraram que as mudanças histopatológicas que ocorrem durante o desenvolvimento do tumor são diretamente relacionadas com as mudanças genéticas que atingem os genomas de células na mucosa do cólon. Mais importante, tornou-se palusível que essas alterações genéticas estavam *causando* a evolução fenotípica dessas células e dos tecidos que elas formam.

Várias observações mostram que o desenvolvimento tumoral pode ser explicado em termos de um processo biológico semelhante à evolução darwiniana. Os resultados de análises genéticas da progressão de câncer de cólon humano forneceram evidências adicionais que corro-

boram esse modelo. (Enquanto o próprio Darwin não sabia virtualmente nada sobre genes e genética, “a síntese moderna” da teoria darwiniana introduz genética mendeliana e populações no processo evolucionário postulado primeiramente por Darwin.)

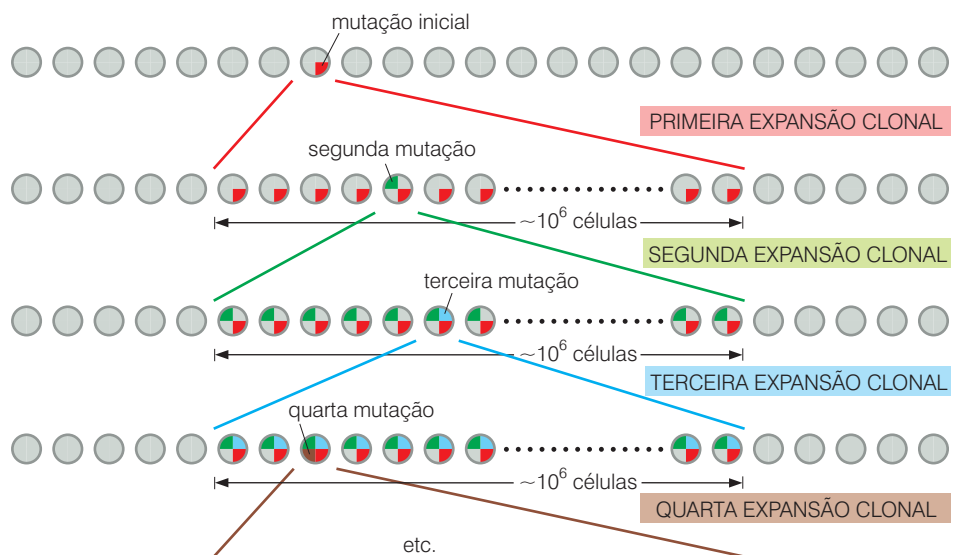
No caso do desenvolvimento do câncer, as unidades envolvidas são células individuais que competem entre si em uma população de células, em vez de organismos individuais que competem entre si dentro de uma espécie. Da mesma forma que a descrição moderna da evolução de Darwin, presume-se que mutações aleatórias criem variabilidade genética em uma população de células. Uma vez que uma população geneticamente heterogênea tenha surgido, as forças de seleção podem então favorecer o crescimento excessivo de células individuais (e seus descendentes) que foram favorecidas com alelos mutantes conferindo características vantajosas, notavelmente características que favorecem a proliferação e a sobrevivência dessas células no microambiente de um tecido vivo.

Fazendo-se a combinação da teoria darwiniana com a progressão tumoral e múltiplas etapas, pesquisadores puderam descrever a tumorigênese como uma sucessão de *expansões clonais*. Acompanhe o esquema: uma mutação aleatória cria uma célula que possui características de crescimento e/ou sobrevivência particularmente vantajosas. Essa célula e seus descendentes então proliferam mais efetivamente do que suas vizinhas, finalmente gerando uma ampla população clonal que domina o tecido e desloca vizinhas menos favorecidas geneticamente. Mais cedo ou mais tarde, esse clone celular alcançará um tamanho suficientemente grande (p. ex., 10^6 células) para que uma outra mutação vantajosa, que ocorre aleatoriamente com uma probabilidade de cerca de 1 por 10^6 gerações de células, possa agora ocorrer plausivelmente em uma ou outra célula dentro dessa população clonal (Figura 11.12).

A célula com uma dupla mutação, que prolifera (ou sobrevive) até mais eficazmente do que suas 10^6 irmãs, espalhará um novo subclone que se expandirá e finalmente dominará o meio do tecido local, ofuscando e possivelmente destruindo a população precursora da qual se originou. Depois de essa célula duplamente mutada ter atingido um tamanho grande, como antes, uma terceira mutação pode ocorrer, e o processo de expansão clonal e sucessão se repetirá. Possivelmente, uma sequência de 4 a 6 sucessões clonais, cada uma ocasionada por uma mutação específica, basta para explicar como o câncer progride em nível celular e genético.

Sem dúvida, esse modelo darwiniano de progressão de câncer é simples. Por exemplo, ele deve ser corrigido para responder à descoberta de que alterações epigenéticas de genes, especificamente, metilação do promotor (veja a Seção 7.8), têm um papel importante na elimina-

Figura 11.12 Evolução darwiniana e sucessões clonais A evolução darwiniana envolve expansões de organismos que são favorecidos com genótipos vantajosos e, conseqüentemente, fenótipos; um esquema similar parece descrever como a progressão tumoral ocorre. Uma célula no meio de uma grande população de células sustenta uma mutação inicial (*setor vermelho, topo*) que confere uma vantagem proliferativa e/ou de sobrevivência comparada com as demais células que não possuem essa mutação. Finalmente, os descendentes clonais dessa célula mutante dominam em uma área localizada deslocando as células que não possuem tal mutação, resultando na primeira expansão clonal. Quando esse clone se expande para um tamanho grande o suficiente (p. ex., 10^6 células), a ocorrência de uma segunda mutação que ocorre com uma frequência de 10^{-6} por geração de células pode ocorrer (*setor verde*), resultando assim em uma célula com duas mutações que tem mais vantagens de proliferação e/ou sobrevivência. O processo de expansão clonal então se repete, e a população recentemente mutada desloca (“tem sucesso”) as previamente mutadas. Isso resulta mais uma vez em uma ampla população descendente, na qual uma terceira mutação ocorre (*setor azul*) e assim sucessivamente.



ção das atividades dos genes supressores de tumor. (Nesse ponto encontramos a principal discordância entre progressão tumoral e evolução darwiniana, uma vez que alterações epigenéticas herdáveis, como os eventos de metilação do DNA, nunca foram importantes para direcionar a evolução de uma espécie).

Esse esquema é simples também a outro respeito. Assim, o número de etapas distintas na progressão tumoral pode ser subestimado pela contagem do número de locos genéticos que são alterados durante o processo. Como discutido no Capítulo 7, a inativação de um gene do supressor do tumor é, quase sempre, um processo de duas etapas. Primeiro, uma cópia do gene é mutada (ou metilada) e levada à inativação. Depois, a cópia do gene ainda intacta é eliminada, geralmente pelo processo de perda de heterozigiosidade (LOH). Sabendo disso e do fato de que a eliminação de genes supressores de tumor representam a maioria das mudanças genômicas que ocorrem durante a evolução do tumor, concluímos que o número de alterações distintas que ocorrem durante a progressão tumoral pode ser quase duas vezes maior do que o número de locos envolvidos no processo.

Uma vez que a expansão clonal é provocada por uma alteração genética ou epigenética que ocorre pouco (ou pares de alterações, no caso de genes supressores de tumor), essas expansões provavelmente podem ser separadas no tempo. Durante o desenvolvimento de cânceres de cólon esporádicos, uma década ou mais pode separar uma alteração genética crítica da próxima, e, em muitos indivíduos, o processo completo pode chegar próximo de um século. (Por exemplo, uma das etapas-chave – a evolução de pólipos para câncer invasivo – foi estimada em levar de 4 a 11 anos, dependendo do grau de displasia presente no pólipo.) Além disso, é evidente que algumas pessoas desenvolvem carcinomas esporádicos de cólon em menos tempo e, assim, essa tabela de tempo deve ser comprimida nos cólons desses indivíduos.

Praticamente não conhecemos nada a respeito dos processos que governam a velocidade da progressão de tumores na maioria dos tecidos. No caso do câncer de cólon, o tipo de dieta pode aumentar incrivelmente a taxa na qual os genomas das suas células epiteliais do cólon acumulam mutações (Barra lateral 11.4). Tais taxas de mutações elevadas podem, por sua vez, comprimir o tempo entre as sucessões clonais. Talvez nos indivíduos que consomem determinados gêneros alimentícios, cinco ou menos anos separem as sucessivas expansões clonais, em vez dos 10 a 20 anos usuais. Conseqüentemente, o processo da doença, que normalmente requer um século para alcançar o estágio final de neoplasia, poderá apenas necessitar de 30 ou 40 anos, tempo condizente com a extensão de uma vida humana contemporânea.

Barra lateral 11.4 Quais carcinógenos podem afetar o cólon humano? As taxas de cânceres de cólon variam até 20 vezes entre países. Essas diferenças dramáticas são devidas a diferenças ambientais em vez de graus diferentes de suscetibilidade genética, uma vez que populações que migram de um país para outro exibem taxas de câncer típicas do seu novo país por uma geração (p. ex., veja a Figura 2.20). O “meio ambiente”, nesse caso, é, sem dúvida, os gêneros alimentícios na dieta.

A determinação de carcinógenos no cólon humano representa um empreendimento de complexidade assombrosa. Os gêneros alimentícios que consumimos contêm, por estimativa, entre 5.000 e 10.000 espécies bioquímicas que existem naturalmente em plantas e animais. O cozimento adicional aumenta o número dessas espécies químicas. Em adição, as várias centenas de espécies de bactérias que vivem no cólon humano metabolizam os subprodutos do nosso alimento de maneiras complexas, resultando em aumentos adicionais no número de espécies químicas que existem no nosso trato gastrointestinal. A complexidade enorme resultante de compostos significa que, no presente, e, provavelmente, em um futuro próximo, nosso entendimento sobre as conexões entre a dieta e a progressão do câncer de cólon de múltiplas etapas será derivada em grande parte da epidemiologia em vez da análise do conteúdo do cólon e seus mecanismos de ação bioquímica e biológica.

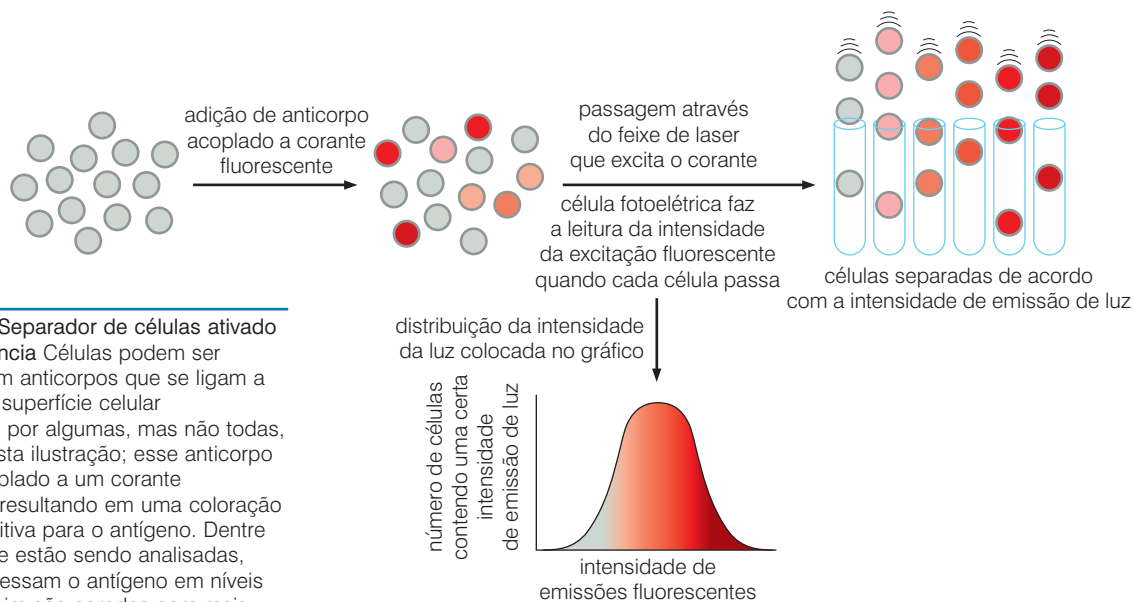


Figura 11.13 Separador de células ativado por fluorescência. Células podem ser marcadas com anticorpos que se ligam a antígenos da superfície celular apresentados por algumas, mas não todas, as células nesta ilustração; esse anticorpo pode ser acoplado a um corante fluorescente, resultando em uma coloração da célula positiva para o antígeno. Dentre as células que estão sendo analisadas, algumas expressam o antígeno em níveis maiores e assim são coradas com mais intensidade pelo anticorpo (*vermelho-escuro*), enquanto outras são coradas mais fracamente pelo anticorpo (*rosa*) ou não são coradas (*cinza*). Essa mistura de células, em suspensão, é analisada em feixe único de *laser* que excita o corante (causando a emissão de luz) e uma célula fotoelétrica que mede a intensidade da emissão de fluorescência das moléculas de corante que marcam cada célula. Essas medidas podem então ser integradas e colocadas em gráficos de distribuição de sinais, nos quais esse procedimento é normalmente denominado de “citometria de fluxo” (*abaixo*). Alternativamente, se o procedimento de marcação não danificou essas células, elas poderão ser separadas uma das outras com base na intensidade de suas fluorescências (p. ex., por meio do uso de um campo elétrico), que permite que as propriedades biológicas dessas células sejam medidas por outros testes (*direita*). Com frequência, a intensidade de marcação de dois anticorpos diferentes, cada um acoplado a uma marcação fluorescente distinta, permite medidas simultâneas das intensidades dos dois antígenos diferentes, em que cada caso uma convenção gráfica diferente é usada, como mostrado na Figura 11.14. Medidas de intensidade de fluorescência obtidas dessa maneira são normalmente colocadas em escala logarítmica.

Determinadas alterações dentro de células pré-malignas podem conspirar juntamente com uma dieta carcinogênica exógena para acelerar o ritmo da progressão de tumor de cólon. Assim, a mutabilidade aumentada pode ser causada por defeitos na complexa maquinaria celular que é dedicada para manter e reparar o DNA celular. Por exemplo, como discutido no Capítulo 12, alguns indivíduos herdam mutações que comprometem o funcionamento da maquinaria de reparo do DNA celular. Devido à persistência do DNA defeituoso resultante, taxas de mutação muito aumentadas são observadas nas suas células epiteliais do cólon, e isso leva, por sua vez, a uma velocidade muito aumentada de formação de crescimentos pré-malignos e malignos no cólon – a síndrome do câncer de cólon hereditário não-poliposo (HNPCC). Ainda mais comum, entretanto, os defeitos nos componentes do aparato de reparo de DNA resultam de mutações somáticas (ou metilação do promotor) que ocorrem cedo na progressão de tumor; a debilidade resultante do aparato de reparo e a mutabilidade aumentada do genoma garantem que etapas de mutação subsequentes na progressão do câncer de cólon ocorrerão relativamente rápido. Esses fatores múltiplos que influenciam a formação do carcinoma de cólon atrapalham as tentativas de prever as sucessões clonais pelo modelo darwiniano de progressão do tumor.

11.6 Células-tronco tumorais complicam ainda mais os modelos darwinianos de sucessão clonal e progressão de tumor

O modelo de sucessão clonal propõe que uma célula mutante espalha vários descendentes e que entre esses numerosos descendentes um novo evento de mutação acionará uma onda de expansão clonal (veja a Figura 11.12). Entretanto, alguns experimentos têm questionando a idéia de que todas as células dentro do clone celular pré-neoplásico (ou neoplásico) são biologicamente equivalentes e, por isso, igualmente capazes de se tornar ancestrais de um novo clone sucessor de células. Nesses experimentos, as células cancerosas dentro de um tumor humano são separadas em subclasses distintas. Essas separações tomam vantagem das proteínas da superfície celular apresentadas por diferentes subpopulações. Em particular, a técnica de separação de células ativada por fluorescência (FACS) foi usada para separar células cancerosas vivas depois de marcá-las (via suas proteínas de superfície) com anticorpos marcados com corantes fluorescentes (Figura 11.13). As células separadas por esse procedimento podem ser recuperadas na forma viável e utilizadas em experimentos biológicos, incluindo testes *in vivo* sobre a sua habilidade em espalhar tumores após a injeção em camundongos hospedeiros imunocomprometidos.

O uso da técnica de FACS inicialmente possibilitou aos pesquisadores segregar populações de células de leucemia mielogênica aguda (AML) em populações majoritárias e minoritárias; em um desses experimentos, as minoritárias representaram menos de 1% das células neoplásicas da massa tumoral. Apenas em torno de 5 mil células da subpopulação minoritária foram capazes de produzir novos tumores após injeção em camundongos hospedeiros e, por isso, foram consideradas “tumorigênicas”; em contrapartida, mais de 500 mil células AML da subpopulação majoritária eram incapazes de disseminar um tumor. É importante salientar que essas células na subpopulação majoritária exibiram características semelhantes aos granulócitos diferenciados ou monócitos, e que elas tinham habilidade limitada de proliferação. Tais observações forneceram evidências convincentes de que os tumores AML eram compostos por pequenas populações de células tumorogênicas auto-renováveis e grandes populações de células mais diferenciadas que tinham pouca, se alguma, capacidade de proliferar *in vitro*.

Experimentos posteriores estenderam esses resultados para células de câncer de mama humano preparadas diretamente do tumor. Nesses últimos experimentos, a população minoritária de células tumorogênicas dentro de um tumor representou apenas cerca de 2% de toda a população de células neoplásicas. Várias centenas dessas células minoritárias semearam um novo tumor quando injetadas em um camundongo hospedeiro, enquanto 20 mil células da população de células ma-

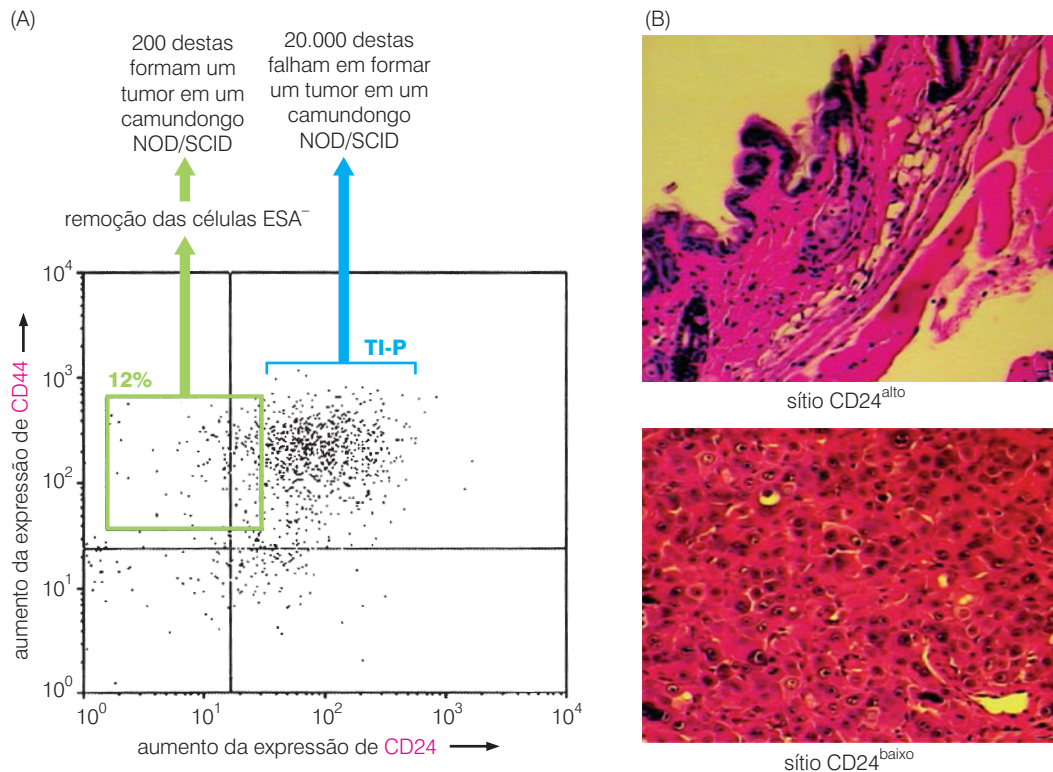
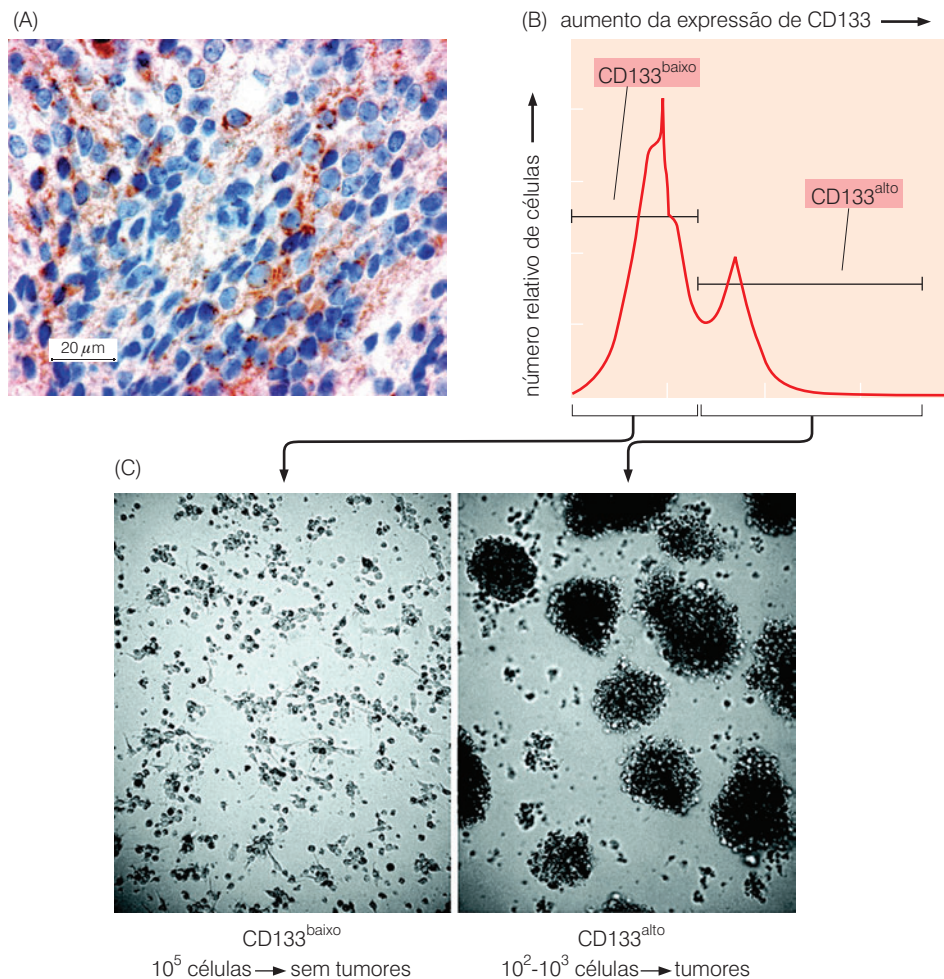


Figura 11.14 Enriquecimento de células-tronco de câncer de mama (A) Células metastáticas de carcinoma de mama humano foram separadas de células não-cancerosas (estromais) e separadas umas das outras em um separador de células ativado por fluorescência (FACS; veja a Figura 11.13). A expressão de dois antígenos de superfície celular distintos – CD24 e CD44 – foi medida simultaneamente, cada uma sendo detectada por um anticorpo monoclonal específico acoplado a um corante fluorescente distinto. A intensidade da coloração foi colocada em um gráfico em escala logarítmica em cada eixo. Cada ponto preto no gráfico representa a detecção de uma única célula. Neste experimento, 12% de uma subpopulação de células que expressaram pequenas quantidades de antígeno CD24 e altas de CD44 (caixa verde) foram separadas de células (T1-P) que mostraram alta expressão de CD24 e alta de

CD44 (colchete azul). (As células na população minoritária de 12% foram enriquecidas pela escolha daquelas células que expressaram o antígeno de superfície epitelial [ESA], que resultou na eliminação de células contaminantes que não expressavam esse antígeno.) (B) Aproximadamente 200 das células resultantes enriquecidas CD24^{baixo} CD44^{alto} ESA⁺ foram hábeis em formar tumores após serem injetadas em camundongos imunocomprometidos NOD/SCID (CD24^{baixo}, *abaixo*), enquanto 20 mil células CD24^{alto} CD44^{alto} falharam em fazê-lo (CD24^{alto}, *acima*). A imagem *superior* mostra um corte pelo local subcutâneo da implantação da célula, na qual a pele relativamente normal e a parede muscular subjacente estão aparentes; a imagem *inferior* mostra um corte pelo tumor formado. (De M. Al-Haji, M.S. Wicha, A. Benito-Hernandez et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 3983-3988, 2003.)

Figura 11.15 – Enriquecimento de células-tronco de tumor de cérebro Células-tronco de tumor cerebral podem ser detectadas por sua expressão de CD133, um antígeno da superfície de células-tronco de uma célula neural. (A) Nesta secção de um meduloblastoma corada por imunofluorescência (um tumor de células cerebrais), células tumorais expressando altos níveis de CD133 (*vermelho-escuro*) se encontram entre outras células tumorais que apresentaram baixos níveis de expressão de CD133. Os núcleos celulares estão corados em *azul*. (B) Populações de células de meduloblastoma humano foram separadas por FACS (Figura 11.13) segundo a expressão mais alta ou mais baixa de CD133 (*níveis aumentados à direita ao longo da abscissa*). O número de células cancerosas (*ordenada*) expressando baixos níveis de CD133 (*pico da esquerda*) representam 80 a 85% desse tumor, enquanto as células que expressam altos níveis de CD133 constituem uma minoria (*pico da direita*). (Note que a intensidade de marcação está representada em escala logarítmica no eixo da abscissa.) (C) Células CD133^{baixo} do pico esquerdo mostraram limitada habilidade proliferativa quando em cultura em suspensão (*painel esquerdo*) e, em alguns experimentos, 10^5 destas células falharam em desenvolver tumor em camundongos hospedeiros. Em contraste, células CD133^{alto} do pico direito formaram várias colônias em culturas em suspensão (*painel direito*), e a injeção de um pouco menos de 10^2 (mais tipicamente 10^3 células) destas células em um camundongo hospedeiro imunocomprometido resultou na formação de um tumor (*não-mostrado*). (De S.K. Singh, I.D. Clarke, M. Terasaki et al., *Cancer Res.* 63 :5821-5828, 2003.)



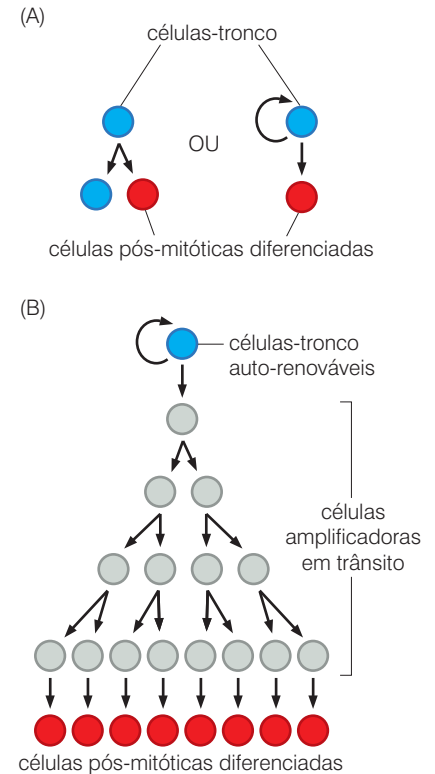
ajoritárias falharam em realizar isso (Figura 11.14). De forma importante, a maioria e a minoria das subpopulações de células do câncer de mama continham células em proporções equivalentes no ciclo de crescimento ativo, e ambas subpopulações foram separadas das células não-malignas (como as células do estroma) que estavam presentes nas massas tumorais originais.

Os tumores que finalmente se desenvolveram após a injeção de células em minoria novamente eram compostos por populações de células minoritárias e majoritárias que apresentavam, como antes, vastas diferenças na sua habilidade de disseminar novos tumores, isto é, na sua tumorenicidade. Resultados semelhantes têm sido obtidos com células de câncer de cérebro (Figura 11.15).

Juntos, esses experimentos indicam que as populações de células neoplásicas em cânceres de mama e cérebro, e com alguma probabilidade, tumores sólidos de vários outros órgãos, são organizadas de forma muito semelhante à organização histológica dos tecidos epiteliais normais, nos quais relativamente poucos grupos de células-tronco auto-renováveis são capazes de espalhar grandes números de células descendentes que têm apenas um potencial proliferativo limitado *in vivo*. Em cada um desses experimentos aqui discutidos (Figuras 11.14 e 11.15), as células tumorigênicas minoritárias expressaram um padrão de marcadores antigênicos em sua superfície que era distinto daquele exibido por células nas populações majoritárias, indicando que os dois grupos de células estavam em estados diferentes de diferenciação.

Como discutido na Seção 8.11, em muitos tecidos normais, células-tronco são menos diferenciadas, e suas descendentes não-tronco normalmente entram em um estado de diferenciação aumentado. Além disso, células-tronco parecem ter essencialmente habilidades ilimitadas de proliferação e, como parte da sua progênie permanece como células-tronco, elas são

Figura 11.16 Células-tronco e sua progênie (A) A organização mais simples do comportamento das células-tronco envolve uma divisão assimétrica das células (azul), na qual uma das células-filhas se torna uma célula-tronco como sua mãe, enquanto a outra filha (vermelha) se diferencia e perde a capacidade de se dividir novamente. Esse comportamento pode ser explicado nos dois gráficos apresentados aqui. (B) Em muitos tecidos, um esquema mais complexo parece funcionar. Como no painel A, uma das filhas de uma célula-tronco em divisão se torna uma célula-tronco. A outra se torna uma “célula amplificadora de transição” (às vezes chamada de “célula progenitora”; cinza), a qual está comprometida a entrar em uma via de diferenciação, mas ainda não participa da diferenciação de estágio final. Em vez disso, essa célula e sua progênie sofrem uma série de divisões celulares simétricas antes que suas descendentes finalmente entrem em um estado totalmente diferenciado (vermelha).



chamadas de “auto-renovadoras”. Em contrapartida, a progênie mais diferenciada de uma célula-tronco freqüentemente entra em um estado pós-mitótico, do qual elas nunca sairão para entrar novamente em um ciclo ativo de crescimento e divisão (Figura 11.16).

Então é tentador pensar que a mesma organização do comportamento celular opere nesses tumores humanos, mas evidências definitivas de tal relacionamento ainda não existem. Além disso, as células cancerosas nas populações majoritárias se comportam muito como as **células amplificadoras em trânsito**, também chamadas de **células progenitoras** (veja a Figura 11.16), que estão presentes em vários tecidos normais e representam intermediários entre células-tronco e suas descendentes totalmente diferenciadas (Barra lateral 11.5).

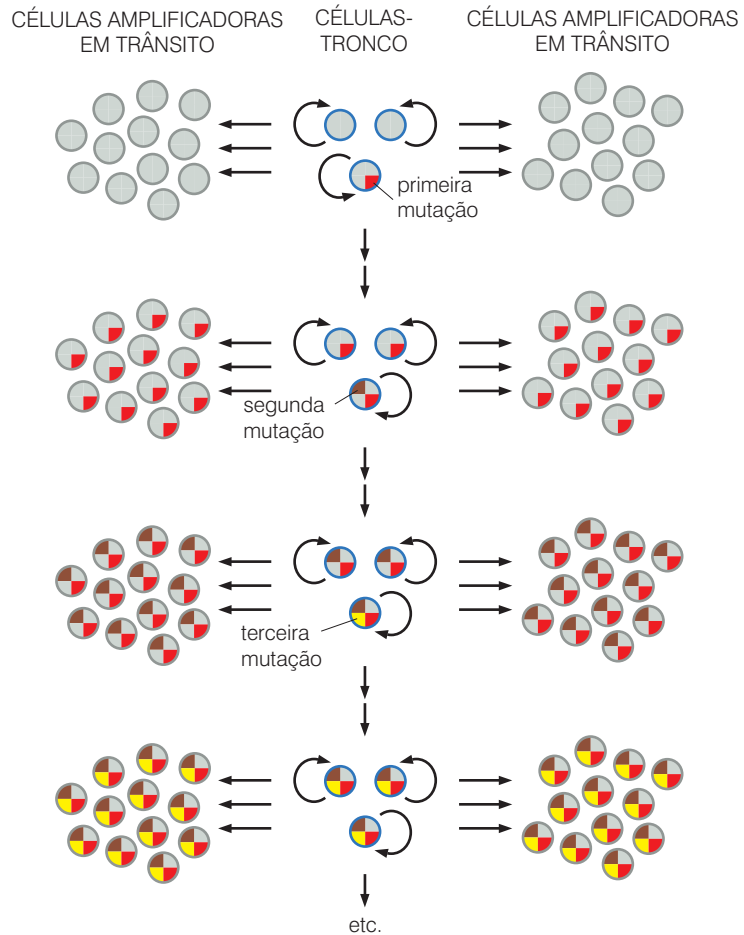
Os resultados desses inúmeros experimentos forçaram-nos a reconsiderar como a progressão tumoral de múltiplas etapas ocorre. Em um esquema revisado, os ancestrais de cada população sucessora nova estão esquematizados a partir de uma pequena minoria da população de células cancerosas predecessoras – células-tronco cancerosas tumorogênicas – em vez de a partir de uma população maior de células neoplásicas amplificadoras em trânsito. Isso significa que as mutações que ocorrem em populações de células-tronco cancerosas (Figura 11.17) podem ser transmitidas às células descendentes na população, enquanto mutações que ocorrem nas células (muito mais numerosas) não-tumorogênicas amplificadoras em trânsito não podem, pois estas células tem apenas um potencial limitado de proliferação. Conseqüentemente, a evolução genética que associamos com a progressão tumoral de múltiplas etapas pode ocorrer em subpopulações relativamente pequenas de células do câncer – a minoria das células-tronco tumorais.

(Esse comportamento é muito semelhante ao comportamento de mutações da linhagem germinativa *versus* as mutações somáticas em metazoários. As mutações da linhagem germinativa podem, em princípio, ser transmitidas a um ilimitado número de células germinativas e células somáticas em gerações subseqüentes do organismo, enquanto as mutações somáticas não podem, pois ocorrem em células que deixam apenas um número limitado de descendentes, os quais desaparecem a qualquer momento quando um organismo individual morre. Seguindo essa analogia, as células-tronco de cânceres representam a “linhagem germinativa” de um tumor.)

Barra lateral 11.5 Células de amplificadoras em trânsito permitem que um pequeno número de células-tronco gerem grandes números de uma progênie diferenciada O esquema mais simples para organizar um tecido que está em contínua regeneração requer que uma filha de uma célula-tronco recentemente formada retenha o fenótipo da célula-tronco da mãe, enquanto a outra filha imediatamente prossegue para um estado pós-mitótico altamente diferenciado, ou seja, torna-se uma célula que nunca mais se dividirá (Figura 11.16A). Na realidade, um esquema um pouco mais complexo parece operar na maioria dos tecidos (Figura 11.16B). Como antes, uma célula-filha retém o fenótipo de célula-tronco da mãe, enquanto a outra se torna progenitora de um grande grupo de células pós-mitóticas diferenciadas. Esta segunda célula-filha pode fazer isso porque ela e sua

progênie imediata – as células amplificadoras em trânsito – desencadeiam um programa de crescimento exponencial por um período limitado antes que as células descendentes se diferenciem e se tornem pós-mitóticas. Conseqüentemente, essa simples célula-filha pode gerar dúzias, se não centenas, de uma progênie diferenciada. Isso significa que (1) as células-tronco necessitam se dividir apenas uma vez para gerar um grande número de descendentes diferenciados; (2) a célula-tronco pode assim se dividir apenas periodicamente em vez de continuamente, mesmo em um tecido no qual células diferenciadas estão continuamente sendo perdidas e recolocadas; e (3) a grande maioria das divisões celulares em um tecido pode ser atribuída às células amplificadoras em trânsito que estão crescendo exponencialmente.

Figura 11.17 Células-tronco cancerosas e sucessão clonal A existência de células-tronco cancerosas tem importantes implicações de como a progressão tumoral e a sucessão clonal ocorrem. No esquema apresentado aqui, células menos diferenciadas (i. e., células-tronco cancerosas) podem se diferenciar para células amplificadoras em trânsito, mas o processo reverso (a de-diferenciação de células amplificadoras em trânsito para células-tronco cancerosas) não ocorre. Além disso, as células-tronco cancerosas representam a minoria de células neoplásicas em massas tumorais, enquanto as células amplificadoras em trânsito representam a maioria das células neoplásicas. Então, mutações que ocorrem no genoma de células-tronco tumorais podem ser transmitidas para as células-tronco descendentes, que podem então desencadear novas sucessões clonais (veja a Figura 11.12). De forma contrária, mutações que ocorrem no genoma de células amplificadoras em trânsito não podem ser transmitidas adiante, pois estas células têm apenas uma habilidade replicativa limitada. (Uma exceção neste esquema pode ocorrer se a mutação ocorrida na célula amplificadora em trânsito a converte em uma célula-tronco.)



O cenário revisado também tem implicações nos mecanismos mutacionais que impulsionam a progressão de tumores. Durante a formação de alguns tumores, como o câncer de mama analisado na Figura 11.14, as mutações responsáveis por iniciar novos ciclos de sucessão clonal devem acontecer em populações celulares na ordem de dezenas de milhares em vez de milhões, e as taxas de mutação (i. e., o número de mutações ocorridas por divisão celular) requeridas para desencadear essa sucessão clonal devem ser muito mais elevadas do que havíamos previsto. Em outros tumores, entretanto, em que a proporção de células-tronco cancerosas é muito mais alta (veja a Figura 11.15), o tamanho da população-alvo seria muito maior, necessitando de uma menor taxa de mutação para que a progressão tumoral proceda.

11.7 Um trajeto linear de sucessão clonal simplifica a realidade do câncer

Os dois esquemas de sucessão clonal propostos até agora (Figuras 11.12 e 11.17) sugerem que todas as células dentro de uma massa tumoral que participam de uma expansão clonal determinada são geneticamente idênticas entre si e que a formação de um tumor ocorre como consequência de uma série linear dessas sucessões clonais. De acordo com esses esquemas, se fôssemos analisar as células dentro de uma massa celular pré-maligna ou maligna, quase sempre observaríamos que um único clone geneticamente homogêneo de células domina nessa massa, uma vez ele cresceria muito e deslocaria o clone de células precedentes das quais ele se originou. (Note que as células-tronco e as células amplificadoras em trânsito dentro de uma população clonal são geneticamente idênticas

entre si e diferem entre si apenas fenotipicamente, tendo programas de expressão de genes distintos.)

Entretanto, o atual curso da progressão tumoral é complicado por outros fatores que devemos levar em consideração: na medida em que a progressão tumoral avança, os genomas de tumores freqüentemente se tornam muito mais instáveis, e as taxas nas quais as mutações são adquiridas durante cada geração de células decolam. A taxa de alterações genéticas e a diversificação genética resultante logo alcançam a taxa na qual a seleção darwiniana (e a eliminação de subclones de células menos adequadas) pode ocorrer. Como consequência, em vez de parecer uma série linear de sucessões clonais, a progressão tumoral atual em várias massas tumorais se assemelha ao esquema altamente ramificado mostrado na Figura 11.18, no qual o número de subclones geneticamente distintos de células coexiste dentro de uma única massa tumoral.

Demonstrações da diversificação genética de células dentro de massas tumorais podem ser obtidas rastreando-se o estado de um único gene de interesse dentro de várias células de um tumor primário. Um exemplo claro (e extremo) de tais diversificações é mostrado na Figura 11.19, que apresenta uma análise – acompanhada pela técnica de FISH (hibridização fluorescente *in situ*) – para determinar o número de cópias dos Cromossomos 11 e 17 em células individuais dentro de um carcinoma de mama humano. Aparentemente, dentro dessa massa tumoral única, o número de cópias desses cromossomos varia enormemente de uma célula para outra. Tal variabilidade implica que os genomas das células tumorais sendo analisados são bastante plásticos e estão continuamente mudando o número de cópias do gene *CCND1* que eles carregam, fazendo isso de forma aleatória e a uma taxa que excede muito a habilidade de seleção (darwiniana) para eliminar menos variantes adequadas.

Análises como essas apenas “arranham” a superfície da diversidade genética que se acumula à medida que as células cancerosas progridem para estados de crescimento ainda mais malignos. Uma outra medida mais sistemática dessa ampla diversificação genética veio a partir de análises de seqüência de segmentos de DNA escolhidos aleatoriamente presentes nos genomas de uma série de 58 carcinomas humanos. (Análises de cada segmento de DNA dependeram do uso da reação em cadeia da polimerase, ou PCR, que permitiu sua amplificação seletiva antes de determinar sua seqüência nucleotídica.) Extrapolando a partir de um número relativamente pequeno de segmentos analisados, pesquisadores estimaram que no mínimo

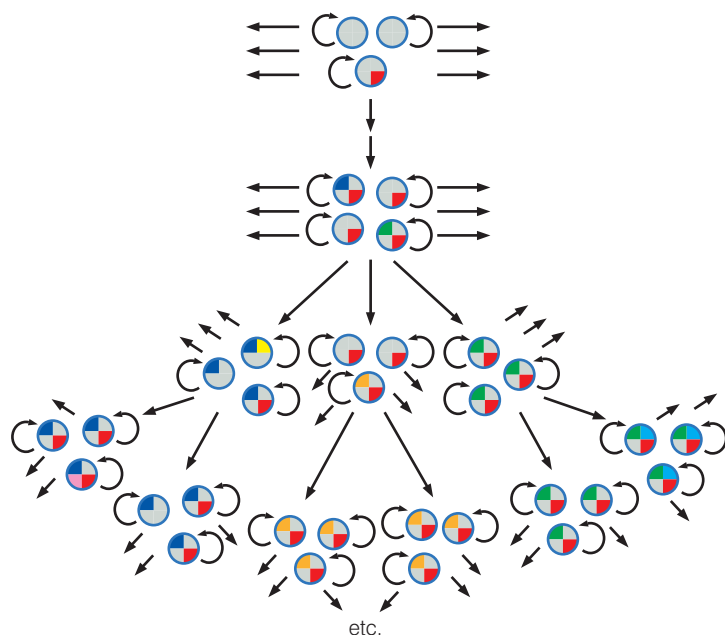
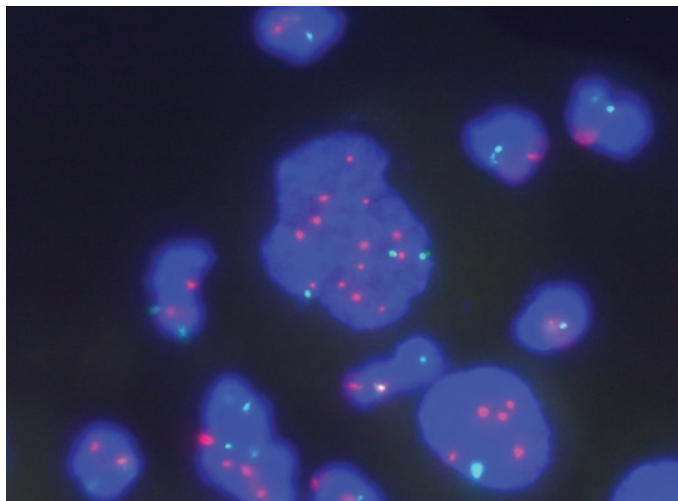


Figura 11.18 Diversificação clonal pelas altas taxas de mutação Na medida em que a progressão tumoral procede, os genomas de populações de células tumorais freqüentemente se tornam bastante instáveis. Quando isso ocorre, a taxa de geração de novos alelos mutantes pode exceder a taxa na qual a seleção darwiniana elimina os clones menos adequados. Conseqüentemente, a massa tumoral torna-se composta por um grande número de setores distintos, cada qual dominado por um subclone geneticamente distinto. Neste diagrama, apenas as populações de células-tronco tumorais estão representadas, enquanto as flechas apontando para fora (ou para baixo) indicam a produção de um grande número maior de células neoplásicas amplificadoras em trânsito (*não-mostrado*).

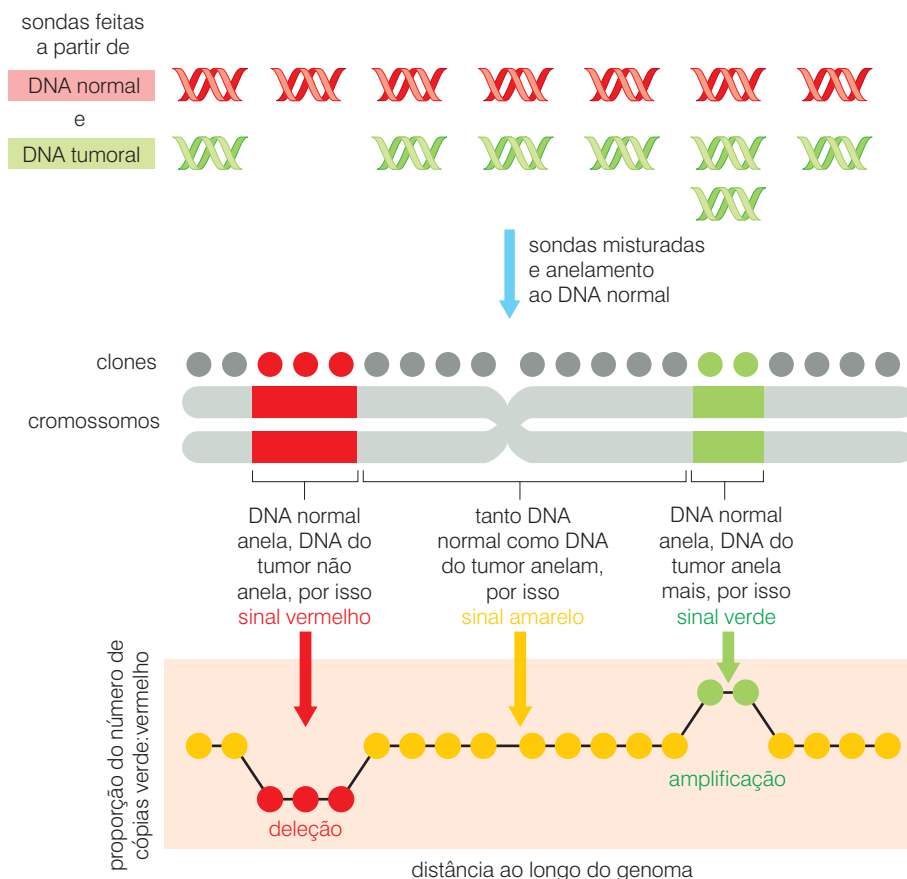
Figura 11.19 A diversidade genética dentro de uma população de células tumorais. Em tumores de *alto grau* (i. e., alta malignidade), os números de cromossomos freqüentemente flutuam bastante de uma célula para outra, indicando uma grande heterogeneidade genética dentro do tumor. Nesta imagem, o número de cópias dos Cromossomos 11 (verde) e 17 (rosa) foi revelado por hibridação fluorescente *in situ* (FISH) em células de *efusão pleural* presentes em paciente com carcinoma de pulmão de células não-pequenas. Em adição às flutuações no número de cromossomos, núcleos gigantes altamente poliploídes estavam aparentes. (Cortesia de M. Fiegl.)

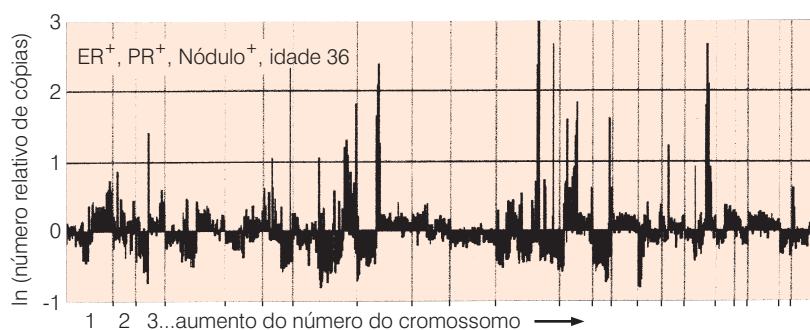


10^4 alterações de seqüências, incluindo muitas alterações de um único nucleotídeo, estavam presentes no genoma de cada um desses tumores esporádicos. Um número similar de modificações foi encontrado nos genomas de 11 adenomas esporádicos. Esta última observação indica que a ampla desestabilização do genoma e a extensa diversificação genética já ocorrem bastante cedo no processo de progressão tumoral em múltiplas etapas.

O uso de técnicas de hibridação genômica comparativa (CGH; Figura 11.20) revela uma dimensão adicional de instabilidade genética. CGH é utilizada para medir aumentos e dimi-

Figura 11.20 Hibridação genômica comparativa CGH permite que um investigador determine se o genoma de uma célula tumoral contém segmentos que estão presentes em maior ou menor número de cópias com relação às que existem no genoma diplóide normal. Como mostrado aqui, fragmentos de DNA normal (vermelho) e de DNA tumoral (verde), cada um marcado por moléculas de corante distintas coloridas, podem ser hibridizados a segmentos de DNA provenientes de regiões definidas de cromossomos pelo genoma de células normais. Aqueles segmentos cromossômicos que anelam apenas com DNA normal são marcados em vermelho, indicando que o DNA correspondente está faltando no DNA tumoral. Ao contrário, aqueles segmentos que anelam apenas com DNA tumoral são marcados em verde indicando que um elevado número de cópias do segmento (p. ex., como uma conseqüente amplificação gênica) está presente no DNA tumoral. Os segmentos de DNA que estão presentes em igual número no DNA normal e tumoral serão registrados em amarelo. (Cortesia de J.W. Gray.)





nuições no número de cópias de vários segmentos de DNA cromossômicos em genomas de células tumorais e gera uma plethora de dados genéticos (Figura 11.21). Algumas dessas flutuações alteram a dosagem de genes-chave indutores de tumor e supressores de tumor e, com isso, afetam a proliferação de subclones de células neoplásicas dentro de tumores. O número de mudanças no número de cópias de segmentos cromossômicos excede muito o número de sucessões clonais ocorridas durante a progressão tumoral, mostrando, mais uma vez, a riqueza da diversificação genética presente em uma única massa tumoral.

As consequências dessa heterogeneidade genética acumulada provavelmente serão manifestadas em dois níveis. *Dentro* de uma determinada massa tumoral, diferentes subclones carregarão grupos distintos de alterações genéticas, como mostrado na Figura 11.18. Essa heterogeneidade também afeta comparações *entre* tumores do mesmo tipo que surgem em pacientes diferentes. Os genótipos desses tumores (p. ex., carcinomas de cólon no mesmo estágio histopatológico de progressão tumoral que surgem em 20 pacientes diferentes) são provavelmente marcados de formas diferentes entre si.

11.8 O modelo darwiniano de desenvolvimento do tumor é difícil de ser validado experimentalmente

Enquanto o modelo darwiniano de desenvolvimento tumoral, como descrito esquematicamente nas Figuras 11.12, 11.17 e 11.18, é atraente no conceito, ele continua um pouco mais do que uma construção teórica. Os resultados desse modelo são, sem dúvida, verdadeiros, mas seus detalhes são muito difíceis de serem validados por uma série de razões. Para começar, uma validação convincente do modelo darwiniano necessitaria de uma identificação das alterações-chave genéticas ou epigenéticas dos genomas celulares que são responsáveis por cada expansão clonal e, assim, por cada etapa da tumorigênese de múltiplas etapas. Entretanto, o vasto número dessas alterações acumuladas nos genomas dos tumores (Seção 11.7) excede muito o número de sucessões clonais que dirigem a progressão tumoral. Consequentemente, análises de seqüências dos genomas de células em diferentes estágios da progressão tumoral provavelmente não convergem nas alterações genéticas críticas que são responsáveis por várias sucessões clonais.

Tais análises de seqüência são encarregadas por um outro problema: como já sabemos, a inativação de genes-chave supressores de tumor é causada freqüentemente pelo processo epigenético de silenciamento do gene via metilação do promotor (Seção 7.8). Os genes funcionalmente inativados dessa maneira aparecerão como alelo do tipo selvagem no seqüenciamento de DNA, e seu silenciamento pode ser determinado somente por análises do estado de metilação de seus promotores ou por busca de seus transcritos dentro de células tumorais. Os últimos cenários, freqüentemente chamados de **genômica funcional**, também podem não ser particularmente úteis, uma vez que provavelmente eles não distinguem entre o silenciamento gênico que é uma consequência do programa normal de diferenciação e o silenciamento gênico que resulta do processo patológico de metilação do promotor.

Uma visão clara desse modelo darwiniano também exige algum conhecimento da *cinética* de cada etapa da progressão tumoral de múltiplas etapas – isto é, de quanto tempo cada etapa

Figura 11.21 Análise por CGH do genoma de um câncer de mama O DNA genômico de um câncer de mama humano ER⁺ (positivo para receptor de estrogênio), PR⁺ (positivo para receptor de progesterona), Nódulo⁺, (linfonodos contendo células cancerosas metastáticas), estágio 4 (avanzado) foi analisado aqui utilizando a análise de hibridização genômica comparativa (Figura 11.20). Todos os 22 autossomos humanos foram representados por sondas, começando a partir do Cromossomo 1 (*esquerda*) até o Cromossomo 22 (*direita*), cada um sendo colocado em uma das áreas delineadas pelas linhas verticais. O grau de amplificação ou deleção é indicado pelas linhas a partir do número normal de cópias, que é indicado na ordenada por "0", uma vez que os dados são colocados de forma logarítmica, com as amplificações indicadas acima da linha e as deleções abaixo da linha. Por exemplo, observou-se que um segmento do Cromossomo 8 estava presente neste tumor, em um número de cópias que é maior do que 2 unidades logarítmicas naturais (i. e., um fator $> e^2$). Essa análise não consegue resolver entre aqueles segmentos cujo número alterado de cópias tiveram um papel crítico no desenvolvimento tumoral e outros segmentos cujo número alterado de cópias reflete a ampla instabilidade cromossômica que sabidamente opera em vários tumores humanos avançados. Essa análise indica instabilidade genômica extrema e a diversificação genética resultante de subclones de células cancerosas dentro desse tumor. (Cortesia de J.W. Gray.)

Barra lateral 11.6 A epidemiologia do câncer de pulmão proporciona um indício para a etapa final na progressão de tumor de múltiplas etapas. As cinéticas com as quais etapas individuais da progressão do câncer ocorrem são extremamente difíceis de medir. Entretanto, um aspecto peculiar da epidemiologia do câncer de pulmão nos proporciona uma medida da etapa final da progressão de um tumor. Quando um fumante de muito tempo deixa de fumar, a taxa na qual ele contrai câncer de pulmão permanece relativamente constante por ano para cada ano do seu tempo de vida restante. Esse fato sugere que todas as etapas na progressão de um tumor que levam a câncer de pulmão, exceto a última etapa, já ocorreram nos pulmões do fumante quando ele parou de fumar. A última etapa necessária, que não pode ser desencadeada diretamente pelo fumo, então ocorre com uma probabilidade constante por unidade de tempo pelo resto de sua vida. Uma vez que essa etapa final limitante ocorre, a formação de um tumor clinicamente detectável parece ocorrer rapidamente. Infelizmente, a natureza biológica e a genética dessa última etapa permanecem obscuras.

necessita. Algumas dessas etapas, como a mutação pontual que ativa os oncogenes *ras*, podem ocorrer em uma frequência de 10^{-6} a 10^{-7} gerações de células, enquanto outras etapas críticas, como a perda de heterozigosidade (LOH), parecem ocorrer com frequência de 100 a 1.000 vezes mais alta. Ainda não conhecemos a frequência por geração de células de outros eventos críticos, incluindo metilação de promotores, amplificação gênica, deleção gênica e perda de cromossomos inteiros. Ainda, algumas etapas da progressão tumoral podem ocorrer tão rapidamente (comparadas com outras) que elas nunca serão registradas como etapas “limitantes”, ou seja, etapas que seguram a marcha da progressão tumoral.

Alguns desses processos podem ser influenciados pelo ambiente mutagênico da célula ou, no caso de instabilidade cromossomal, podem ocorrer ocasionalmente durante a escassa janela de tempo para a progressão tumoral (Seção 10.11). Então existe um outro alvo: como mencionado antes, genomas de células tumorais frequentemente se tornam mutáveis à medida que a progressão tumoral avança por causa da degradação de um ou outro componente do aparato de reparo do DNA.

Com raras exceções (veja a Barra lateral 11.6), esses fatores tornaram quase impossível medir a cinética das etapas individuais da progressão tumoral; isso, por sua vez, torna uma enumeração de todas as etapas individuais virtualmente impossível. Quando unidas, essas considerações indicam que ainda estamos longe de sermos capazes de entender com alguma precisão como qualquer tumor humano surge.

11.9 Múltiplas linhas de evidências revelam que células normais são resistentes à transformação por um único gene mutado

As dificuldades em catalogar as etapas cruciais na progressão tumoral, como enumeradas anteriormente, indicam que não podemos confiar nas observações de tumores que surgem naturalmente como a única fonte de nosso conhecimento sobre a biologia da carcinogênese. Lições muito mais definitivas sobre o desenvolvimento do câncer podem ser bem-estudadas pela intervenção ativa no processo de tumorogênese, isto é, pela sua reconstrução em detalhes no laboratório. Em particular, a introdução de alterações genéticas bem-definidas em células anteriormente normais (i. e., tipo selvagem) oferece o prospecto elucidativo preciso de como mudanças específicas no genótipo colaboram para criar um fenótipo de célula cancerosa.

As raízes dessa estratégia experimental podem ser traçadas de volta para os experimentos de Temin (Seção 3.2) – e, mais tarde, para aqueles de outros pesquisadores –, nos quais células de galinhas e de mamíferos propagadas em cultura eram expostas a vários oncogenes por meio da infecção de vírus tumorogênicos. Subseqüentemente, experimentos parecidos exploraram a técnica de transfecção de DNA para a introdução de oncogenes em células em cultura (Seção 4.2). Em todos esses experimentos, a transformação com sucesso foi medida pela aparência do foco de células morfologicamente transformadas em garrafas de cultura. Testes adicionais de crescimento independente de ancoramento e a habilidade de formar tumores em animais hospedeiros adequados forneceram uma validação adicional para o estado transformado de tais células modificadas geneticamente.

Alguns desses experimentos pareceram indicar que as regras genéticas que governam a transformação de células de mamíferos são, na verdade, extremamente simples. Lembre, por exemplo, o experimento em que um mutante, o oncogene *H-ras* ativado de um carcinoma de bexiga humano, foi introduzido via transfecção em fibroblastos NIH 3T3 de camundongos normais. Uma vez adquirido o oncogene mutante *ras*, essas células se tornaram totalmente transformadas, até o ponto em que eram capazes de semear tumores em camundongos hospedeiros apropriados (Capítulo 4).

Esse comportamento das células NIH 3T3 transformadas com *ras* indicou que os requerimentos para transformá-las eram mínimos. Uma simples alteração genética delas – a aquisição de um oncogene *ras* – bastava para convertê-las em um estado tumorogênico transforma-

do. Além disso, a mutação que originalmente criou o oncogene *ras* era uma simples mutação pontual. Isso sugeriu que uma mutação pontual que afeta uma das células NIH 3T3 com proto-oncogenes H-*ras* nativos geraria resultados idênticos – total transformação para um estado neoplásico. Em outras palavras, uma mutação pontual é capaz de converter uma célula normal em uma célula tumoral.

Sabemos, de discussões anteriores sobre a genética celular de tumores humanos, que essa conclusão está errada. Uma simples mutação pontual – na verdade um evento único de mutação de qualquer tipo – não pode, por si só, gerar uma célula cancerosa a partir de uma célula normal preexistente. Podemos verificar esse fato a partir de um cálculo simples. Dada a taxa na qual mutações pontuais específicas ocorrem aleatoriamente no genoma humano e o número de células do corpo humano ($> 3 \times 10^{13}$), foi estimado que vários milhares de oncogenes H-*ras* novos mutados são criados todos os dias no corpo humano e que o número total de células do corpo que carregam oncogenes *ras* deva ser em torno de milhões. Claramente, os seres humanos não são acometidos com um número comparável de novos tumores diariamente.

Algo de muito errado ocorreu, ou nesses cálculos ou nos experimentos de transfecção que usamos para medir a complexidade genética do processo de transformação. O local natural para procurar por problemas é no desenho do experimento usado para informar nosso pensamento, especificamente nas células que foram usadas no ensaio de transformação. As células NIH 3T3 não podem ser consideradas células normais, uma vez que constituem uma linhagem de células – uma população de células que foi adaptada para crescer em cultura e que podem ser propagadas indefinidamente (Capítulo 10). Isso implica que elas, em algum ponto, sofreram uma ou mais alterações genéticas ou epigenéticas que permitem que elas cresçam em cultura e proliferem de uma maneira imortalizada.

Sabendo desse fato, pesquisadores começaram, no início dos anos 1980, a examinar as consequências de introduzir um oncogene *ras* em células verdadeiramente normais – aquelas de rato, camundongo ou embriões de hamster que recentemente foram extraídas de tecidos vivos e propagadas *in vitro* por um curto período antes de serem usadas nos experimentos de transfecção gênica. Essas células – às vezes chamadas de **células primárias** – provavelmente não sofreram as alterações que aparentemente afetaram as células NIH 3T3 durante seus longos meses de adaptação a cultura de tecidos e acompanhante imortalização.

Os resultados obtidos com células primárias de ratos e hamsters foram muito diferentes daqueles observados previamente com células NIH 3T3. As células primárias não eram suscetíveis à transformação induzida por *ras*. Experimentos controles não deixaram dúvidas de que essas células adquiriram o oncogene transfectado e eram capazes de expressar a oncoproteína Ras codificada, mas de alguma forma elas não respondem pela transformação sofrida. Isso forneceu a primeira evidência de que o ato de adaptar células de roedores a condições de cultura e selecioná-las pela imortalização gera células que se tornaram responsivas à transformação por um oncogene *ras* introduzido.

As implicações adicionais dessas observações são claras. Células imortalizadas na verdade não são normais, mesmo exibindo várias características normais, como inibição por contato e dependência de ancoramento. De fato, como seu estado anormal as torna suscetíveis à transformação induzida por *ras*, podemos considerar que elas sofreram algum tipo de mudança genética (ou epigenética) pré-maligna muito antes de serem confrontadas com esse oncogene introduzido.

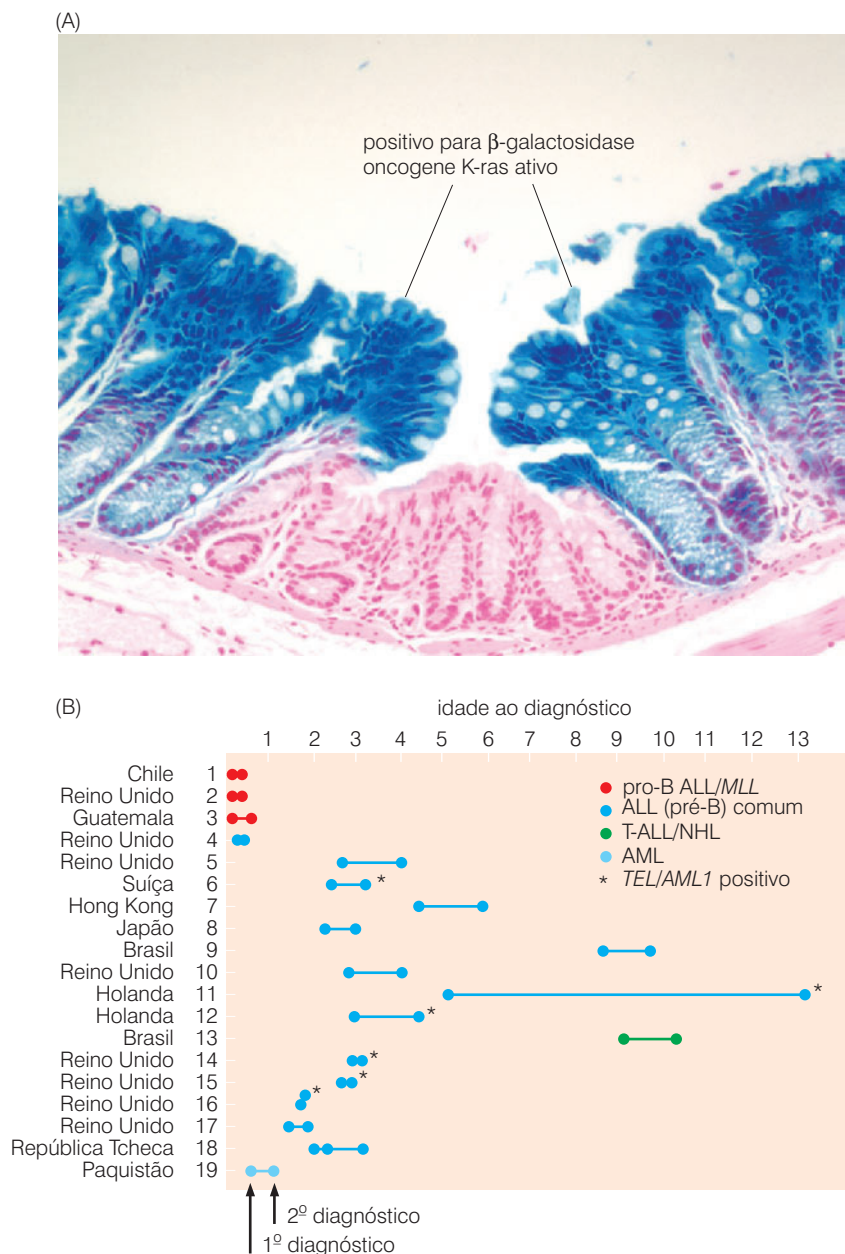
Está claro que pressões seletivas *in vitro* que produzem linhagens celulares imortalizadas são bastante diferentes daquelas que as células pré-malignas em desenvolvimento sofrem dentro dos tecidos vivos. De forma alguma, as características biológicas e, muito possivelmente, os genes mutantes adquiridos durante a propagação *in vitro* podem ser idênticos a vários daqueles que surgem durante a progressão tumoral *in vivo*. (De fato, nossas discussões no capítulo anterior revelaram que as **mesmas** vias regulatórias – aquelas controladas pelas proteínas p53 e pRb – que são alteradas durante a imortalização celular também são encontradas de forma

truncada em uma ampla variedade de genomas de células cancerosas, incluindo aquelas de tumores humanos.)

Esses experimentos com células primárias têm sido estendidos pela introdução de oncogenes *ras* ativados em células epiteliais do cólon de camundongos. Uma vez ativado, as células resultantes que expressam o oncogene *ras* criam nada mais do que um epitélio hiperplásico, que são, essencialmente células normais que estão presentes em números excessivos, mas são, em outros aspectos, essencialmente normais (Figura 11.22A).

Certos experimentos da natureza também suportam a idéia de que mutações simples não são suficientes para o desenvolvimento de cânceres. Por exemplo, alguns indivíduos nascem carregando uma mutação na linhagem germinativa do gene que codifica para o receptor do fator de crescimento Kit; tais mutações criam um receptor Kit permanentemente ativo, independente de ligante, que funciona como uma potente oncoproteína. Esses indivíduos têm alto

Figura 11.22 Lesões genéticas únicas e a iniciação de um tumor: experimentos de laboratório e experimentos da natureza (A) A linhagem germinativa de camundongo foi remodelada para criar células epiteliais de cólon em que tanto oncogenes K-*ras* mutantes como o gene mutante para β -galactosidase podem ser ativados em células por infecção por adenovírus. Como indicado aqui, células epiteliais do cólon nas quais tanto a β -galactosidase (azul) como o oncogene K-*ras* (não-visível) foram expressados criaram regiões localizadas de hiperplasia nas quais as células epiteliais são, de outra forma, normais, indicando que o oncogene *ras* por si só não é suficiente para transformar essas células para o estado tumorigênico. (B) Foi documentado que vários gêmeos *monoigóticos* (idênticos) pelo mundo desenvolveram o mesmo tipo de leucemia. As leucemias invariavelmente mostraram o mesmo marcador cromossomal ou mutação, indicando que elas derivaram de um mesmo clone celular. O fato de que várias dessas leucemias são diagnosticadas em diferentes idades pós-natais (*pontos*) indica que essas mutações somáticas, que ocorreram na vida *intra-uterina*, não são suficientes, por si só, para desencadear a formação de leucemia clinicamente aparente. As marcações (*topo, à direita*) e as cores associadas denotam os diferentes subtipos de leucemias identificados por marcadores genéticos diferentes. (A, cortesia de K.M. Haigis e T. Jacks; B, de M.G. Greaves, A.T. Maia, J.L. Wiemels e A.M. Ford, *Blood* 102:2321-2333, 2003).



Barra lateral 11.7 Gêmeos idênticos proporcionam evidências de que mutações singulares são necessárias, mas não suficientes, para a transformação. Iniciando em 1882, uma série de relatos médicos descreveu mais de 70 grupos de gêmeos **monozigóticos** (ou seja, idênticos) em que ambos desenvolveram o mesmo tipo de leucemia, frequentemente na infância. Durante as duas décadas passadas, um grupo de 19 gêmeos desses foi caracterizado geneticamente para validar (1) a sua origem comum, em cada caso, a partir do mesmo ovo fertilizado e (2), na grande maioria dos casos, a presença de translocações cromossômicas idênticas nas células leucêmicas de ambas as crianças de cada par de gêmeos. Algumas dessas translocações foram submetidas a clonagem gênica e análise detalhada da sequência para verificar sua identidade e remover todas as dúvidas sobre a origem **pré-natal** comum dessas mutações. Em cada caso, a translocação cromossômica iniciadora deve ter surgido em um dos gêmeos no *útero*. Logo após, as células do clone de células mutantes resultantes

são passadas durante a gestação para o outro gêmeo via uma circulação placentária comum. (As células não-leucêmicas em ambos de um par são sempre normais geneticamente, indicando que a mutação iniciadora é de origem somática, e não de linhagem germinativa.)

Além da mutação que é comum entre as duas populações de células leucêmicas, cada leucemia frequentemente apresenta suas próprias anormalidades distintas de DNA e/ou cromossômicas, indicando que mutações adicionais ocorreram durante a progressão tumoral pós-natal. Como visto na Figura 11.22B, os gêmeos algumas vezes desenvolvem a leucemia em épocas de vida diferentes, nas quais meses, até anos, separam o tempo de diagnóstico de leucemia dos dois gêmeos em um par. Esse experimento da natureza mostra que um simples evento genético, enquanto necessário para desencadear uma leucemia, não é suficiente, e que outros eventos limitantes devem ocorrer antes que esses tumores se tornem clinicamente aparentes.

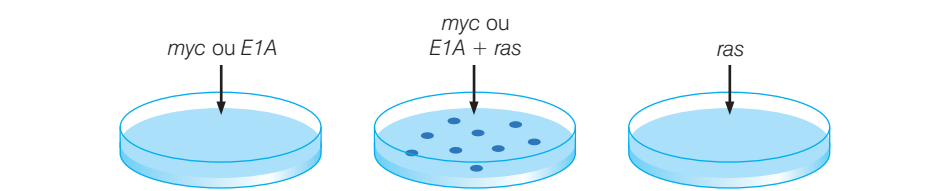
risco de desenvolver tumores gastrintestinais de estroma (GISTs), mas esses tumores apenas aparecem após várias décadas do nascimento, mesmo que a oncoproteína Kit ativa constitutivamente tenha estado ativa em várias de suas células desde o nascimento (Barra lateral 5.8). Similarmente, foi reportado que alguns indivíduos que carregam alelos da mutação *H-ras* na sua linhagem germinativa ainda normalmente desenvolvem tumores apenas após várias décadas. As leucemias infantis observadas em gêmeos são exemplos dramáticos da incapacidade das mutações únicas, atuando por si só, de criar tumores clinicamente aparentes (Barra lateral 11.7). Juntas, essas diversas observações nos mostram que são necessárias várias mudanças para causar um estado tumorogênico na célula.

11.10 A transformação normalmente requer a colaboração entre dois ou mais genes mutantes

A resistência de células de roedores totalmente normais à transformação induzida por *ras* conduz a uma questão interessante: existiriam outros oncogenes que poderiam imortalizar células embrionárias e, ao mesmo tempo, deixar essas células suscetíveis à transformação por *ras*? No início dos anos 1980, pesquisas com DNA de vírus tumorais indicaram que alguns desses agentes carregavam oncogenes múltiplos em seus genomas. Poliomavírus, por exemplo, carrega dois oncogenes, denominados *middle T* e *large T*; em 1982, observou-se que esses dois oncogenes colaboravam um com o outro para transformar células de roedores. A oncoproteína “large T” parece auxiliar a adaptação de células para condições de cultura e facilita sua imortalização, enquanto a proteína “middle T” produziu muitos dos fenótipos associados ao oncogene *ras* – arredondamento de células, perda da inibição por contato e aquisição de crescimento independente da ancoragem. Logo, foi observado que vários outros vírus de tumor empregavam estratégias genéticas similares para a transformação celular.

As genéticas da transformação ocasionadas por vírus tumorais de DNA sugeriram que genes celulares mutantes podem também colaborar na transformação celular. De fato, foi descoberto que uma linhagem de células de leucemia promielocítica humana carregava tanto um oncogene *N-ras* ativado como um *myc* ativado. Tal fato sugere a possibilidade de que esses dois oncogenes celulares estejam cooperando para criar o fenótipo maligno de células leucêmicas. Essa noção logo foi descartada por um experimento simples: quando um oncogene *myc* foi introduzido juntamente com um oncogene *H-ras* em fibroblastos de embriões de ratos (REFs), as células responderam tornando-se morfológicamente transformadas (Figura 11.23) e, o mais importante, tumorogênicas; nenhum desses oncogenes, por si só, poderia criar tais células transformadas.

Figura 11.23 Colaborações do oncogene em células de roedores *in vitro* Culturas primárias de fibroblastos de embriões de rato (REFs) ou células de rim de hamster recém-nascido (BHKs) foram preparadas e expostas a DNAs clonados via o procedimento de transfecção gênica por fosfato de cálcio. A introdução de um oncogene *myc* ou adenovírus *E1A* nessas células (*esquerda*), por si só, não gera focos de transformantes, embora esses oncogenes introduzidos facilitem o estabelecimento dessas células de passagens primárias em culturas de longo prazo. A introdução de um oncogene H-*ras* via transfecção (*direita*) também não produziu focos de células transformadas, embora ele não tenha permitido números significativos dessas células para formar colônias independentes de ancoramento quando elas foram introduzidas em um meio semi-sólido, como ágar diluído. Entretanto, a introdução simultânea de *ras* + *myc* ou, alternativamente, *ras* + *E1A* gerou focos de células transformadas que foram capazes de formar tumores quando elas eram injetadas em hospedeiros singênicos ou imunocomprometidos.



Tais resultados geraram conclusões interessantes. Esses dois oncogenes celulares claramente afetaram o fenótipo de maneiras bastante diferentes, uma vez que eles eram capazes de se complementar na geração da transformação celular. Cada um deles parece ser especializado em ativar um subgrupo de fenótipos celulares associados ao estado transformado. Por exemplo, *ras* foi capaz de gerar independência a ancoragem, uma aparência arredondada e refrátil ao microscópio de fase e perda da inibição por contato; *myc* auxiliou as células a se tornarem imortalizadas e reduziu um pouco sua dependência por fatores de crescimento. Resultados similares foram observados em experimentos nos quais o oncogene *E1A* do adenovírus humano 5 foi utilizado como parceiro de colaboração de um oncogene *ras*. Mais uma vez, foi observado que os dois genes colaboradores têm efeitos complementares no fenótipo celular.

Logo, observou-se que vários outros pares de oncogenes eram capazes de colaborar um com o outro para induzir a transformação de células *in vitro* e a tumorigênese *in vivo* (Tabela 11.1). O oncogene *ras*, por exemplo, também poderia colaborar com o oncogene SV40 *large T*, com o oncogene polioma *large T* ou com o gene mutante *p53* na transformação celular. De forma contrária, *myc* poderia colaborar também com o oncogene polioma *middle T*, com *src* ou com o oncogene *raf* para transformar células.

Na maioria dos casos, os genes de um par em colaboração poderiam ser colocados em dois grupos funcionais – aqueles com propriedades semelhantes a *ras* e aqueles semelhantes a *myc*. Na verdade, nem todos os oncogenes semelhantes a *ras* proporcionam efeitos idênticos nas células; o mesmo poderia ser dito dos membros da classe *myc*. De forma provocativa, os oncogenes semelhantes a *ras* codificam para oncoproteínas citoplasmáticas, enquanto os oncogenes semelhantes a *myc* codificam para produtos que tendem a ser nucleares (Tabela 11.2). Agora sabemos que as oncoproteínas semelhantes a Ras são componentes da cascata de sinalização mitogênica do citoplasma (Capítulo 6), enquanto as oncoproteínas semelhantes a Myc perturbam de várias formas a maquinaria de controle do ciclo celular, que opera no núcleo (Capítulo 8).

Tabela 11.1 Exemplos de oncogenes colaboradores *in vitro* e *in vivo*

oncogene ^a "semelhante a <i>ras</i> "	oncogene ^a "semelhante a <i>myc</i> "	célula ou órgão-alvo
transformação <i>in vitro</i>		
<i>ras</i>	<i>myc</i>	fibroblastos de embrião de rato transfectados
<i>ras</i>	<i>E1A</i>	células de rim de rato transfectadas
<i>ras</i>	SV40 <i>large T</i>	REFs transfectadas
<i>Notch -1</i>	<i>E1A</i>	células de rim de rato transfectadas
tumorigênese <i>in vivo</i>		
<i>middle T</i>	<i>large T</i>	tumores murinos induzidos por poliomavírus
<i>mil (= raf)</i>	<i>myc</i>	tumores de galinhas do vírus da leucemia aviária MH2
<i>erbB</i>	<i>erbA</i>	tumores de galinhas do vírus da eritroblastose aviária
<i>pim1</i>	<i>myc</i>	tumores do vírus da leucemia de camundongos
<i>abl</i>	<i>myc</i>	tumores do vírus da leucemia de camundongos
<i>Notch-1/2</i>	<i>myc</i>	timomas em camundongos transgênicos
<i>bcl-2</i>	<i>myc</i>	linfomas foliculares em camundongos transgênicos

^aOs termos "semelhante a *ras*" e "semelhante a *myc*" se referem a classes funcionais em vez de a genes que codificam para componentes de uma via de sinalização comum. Oncogenes "semelhantes a *ras*" tendem a codificar para componentes das cascatas de sinalização citoplasmáticas, enquanto oncogenes "semelhantes a *myc*" tendem a codificar proteínas nucleares.

Tabela 11.2 Mecanismos fisiológicos da colaboração por oncogenes^a

Par oncogênico	Tipo celular	Mecanismo de ação
<i>ras</i> + SV40 <i>large T</i>	células Schwann de rato	<i>ras</i> : proliferação + proliferação de captura <i>large T</i> : previne a proliferação de captura e reduz a necessidade de mitógeno
<i>ras</i> + <i>E1A</i>	fibroblastos de embrião de camundongo	<i>ras</i> : proliferação e senescência <i>E1A</i> : previne a senescência
<i>erbB</i> + <i>erbA</i>	eritroblastos de galinha	<i>erbB</i> : induz a proliferação independente de GF <i>erbA</i> : bloqueia a diferenciação
<i>TGF-α</i> + <i>myc</i>	células epiteliais mamárias de camundongo	<i>TGF-α</i> : induz a proliferação e bloqueia a apoptose <i>myc</i> : induz a proliferação e a apoptose
<i>v-sea</i> + <i>v-ski</i>	eritroblastos aviários	<i>v-sea</i> : induz a proliferação <i>v-ski</i> : bloqueia a diferenciação
<i>bcl-2</i> + <i>myc</i>	fibroblastos de rato	<i>bcl-2</i> : bloqueia a apoptose <i>myc</i> : induz a proliferação e a apoptose
<i>ras</i> + <i>myc</i>	fibroblastos de rato	<i>ras</i> : induz a independência pelo ancoramento <i>myc</i> : induz imortalização
<i>raf</i> + <i>myc</i>	macrófagos de galinha	<i>raf</i> : induz a secreção de fatores de crescimento <i>myc</i> : estimula a proliferação
<i>src</i> + <i>myc</i>	células adrenocorticais de rato	<i>src</i> : induz a independência por ancoramento e soro <i>myc</i> : prolonga a proliferação

^aEm cada par, o primeiro oncogene codifica para uma oncoproteína citoplasmática, enquanto o segundo oncogene codifica para uma proteína nuclear.

Esses experimentos de colaboração entre oncogenes proporcionaram um modelo cru *in vitro* da transformação de múltiplas etapas *in vivo* e sugerem um raciocínio para as complexas etapas genéticas que acompanham e causam a formação de tumor em seres humanos: cada uma das alterações genéticas confere à célula tumoral nascente um ou mais dos fenótipos que são necessários para se tornar tumorigênica (veja a Tabela 11.2). Essas contribuições singulares parecem derivar da capacidade de cada um desses oncogenes, perturbar um subgrupo específico de circuitos reguladores dentro de uma célula. Ainda, esses experimentos sugerem que a proliferação e a sobrevivência celular são governadas por vários (dois ou mais) circuitos regulatórios distintos, os quais devem ser perturbados antes que a célula se torne tumorigênica.

Previamente, notamos que os oncogenes agem de maneira pleiotrópica no fenótipo celular, na qual cada um desses genes é capaz de, concomitantemente, induzir várias mudanças distintas no fenótipo da célula. Aceitando isso, também devemos reconhecer que, da forma que os oncogenes são multitalentosos, nenhum deles parece ser capaz, por si só, de evocar todas as mudanças requeridas para que uma célula normal se transforme em tumorigênica. No caso de oncogenes celulares, parece haver um raciocínio evolucionário óbvio para isso, que foi visto anteriormente neste capítulo: uma célula de mamífero não pode tolerar a presença de um proto-oncogene em seu genoma que poderia, em um simples evento de mutação, gerar um oncogene capaz de transformar essas células em células tumorais desenvolvidas. Tal proto-oncogene poderia colocar cada célula do corpo a apenas um pequeno e único passo da malignidade. Isso representa uma outra versão do argumento de que células e tecidos devem colocar múltiplas barreiras ao longo da via das células normais a fim de impedir que se tornem tumorigênicas. É interessante que, sob determinadas condições experimentais, os investigadores podem mascarar esses mecanismos de defesa e ter sucesso em transformar células um único elemento genético (Barra lateral 11.8).

11.11 Camundongos transgênicos proporcionam modelos de oncogenes colaboradores e de transformação celular de múltiplas etapas

Em muitos modelos de patogenia de câncer em roedores, tumores podem ser desencadeados pela exposição do animal a um carcinógeno mutagênico, que age de forma aleatória (algumas vezes chamada de **estocástica**) para originar alelos celulares mutantes que conduzem ao câncer. Uma alternativa para tais protocolos experimentais tem sido conseguida pela inserção de um oncogene mutante já ativado na linhagem germinativa de um

Barra lateral 11.8 As regras da transformação de múltiplas etapas podem ser logradas Existem várias situações experimentais nas quais um único oncogene ou agente genético pode, por si só, gerar uma célula transformada. Por exemplo, fibroblastos de embrião de galinha (CEF) infectados *in vitro* com partículas do vírus do sarcoma de Rous (RSV) parecem ser transformados em tumorigenicidade nesta única etapa. Entretanto, *in vivo*, parece que as células infectadas por RSV formam tumores apenas em locais lesionados, incluindo aqueles locais ao longo dos quais o RSV foi injetado com uma agulha no músculo; portanto, as alterações que ocorreram nos fibroblastos durante a cura dessa lesão parecem ser necessárias para auxiliar o gene *src* do RSV a transformar essas células em células tumorais.

Experimentos com fibroblastos de embrião de rato (REFs) em cultura indicam que, quando uma célula transformada por *ras* é isolada das outras células da placa de Petri (ou seja, não são circundadas por células normais, não-transformadas), esta pode proliferar para formar uma colônia de células tumorigênicas, mesmo sem a ajuda de um segundo oncogene colaborador, como *myc*. Entretanto, quando tal célula é circundada por vizinhas normais (como pode ocorrer *in vivo* durante as etapas iniciais de uma progressão tumoral), ela é incapaz de proliferar para gerar um foco. Assim, experimentos de transformação de uma única etapa podem, às vezes, ter sucesso, pois falham em recapitular certos mecanismos anticâncer que operam em tecidos vivos, que normalmente requerem alterações adicionais dentro de uma célula ou tecido antes que a progressão do tumor possa prosseguir.

camundongo de laboratório, garantindo assim a expressão desses genes em alguns dos tecidos. Na prática, a expressão desse alelo de oncogene deverá ser confinada a um pequeno subgrupo de tecidos no camundongo. (Se essa expressão fosse permitida em todos os tecidos, incluindo aqueles do embrião em desenvolvimento, provavelmente a embriogênese seria tão gravemente comprometida que o feto em desenvolvimento morreria muito antes do final da gestação.)

Uma versão inicial dessa estratégia para criar camundongos **transgênicos** com predisposição ao câncer envolveu a inserção de alelos oncogênicos dos genes *ras* ou *myc* na linhagem germinativa do camundongo (Figura 11.24). Em uma série de experimentos, a expressão do oncogene *ras* e do oncogene *myc* foi colocada sob o comando do promotor transcricional do vírus de tumor mamário de camundongo (MMTV), um retrovírus que especificamente tem como alvo tecidos mamários. O promotor viral é expressado de forma significativa apenas nas glândulas mamárias e, em níveis mais baixos, nas glândulas salivares.

Como antecipado, a presença de um desses dois **transgenes** oncogênicos na linhagem germinativa do camundongo predispõe camundongos ao câncer de mama e, em menos extensão, a tumores de glândula salivar. Apesar da expressão de um desses oncogenes *ras* ou *myc* na maioria, mas não em todas, as células epiteliais da mama desses camundongos, suas glândulas mamárias apresentaram ou mudanças morfológicas mínimas (no caso do transgene *myc*) ou hiperplasia (no caso do transgene *ras*). Além disso, foi observado que os tumores de mama iniciaram na quarta semana de idade – um período de latência significativamente longo (veja a Figura 11.24). Isso provou conclusivamente que a presença de um único oncogene dentro de uma célula normal de um tecido vivo não é, por si só, suficiente para transformar essa célula em uma célula tumoral. Em vez disso, a cinética de formação do câncer de mama nesse camundongo apontou para o envolvimento necessário de um ou mais eventos estocásticos que precisam ocorrer antes que essas células mamárias que carregam o oncogene *ras* ou *myc* progridam para um estado tumorigênico (veja também a Figura 11.22A).

Camundongos duplo-transgênicos, que carregam ambos os transgenes, MMTV-*ras* e MMTV-*myc*, foram criados pelo cruzamento das duas cepas transgênicas descritas anteriormente. Esses camundongos duplo-transgênicos contraíram tumores a uma velocidade muito acelerada e com alta frequência comparada com camundongos que herdaram apenas um desses transgenes (veja a Figura 11.24). Assim, os dois transgenes oncogênicos puderam colaborar *in vivo* para gerar tumores, corroborando as conclusões dos experimentos *in vitro* descritos anteriormente (Seção 11.10).

De maneira curiosa, mesmo com dois oncogenes mutantes expressados na grande maioria das células mamárias desde o início do desenvolvimento, tumores não surgem nesses camundongos logo depois do nascimento, mas, em vez disso, são observados com grande atraso. Assim, a expressão concomitante de dois oncogenes potentes ainda não era suficiente para transformar totalmente células epiteliais mamárias de camundongo (MECs); em vez disso, tais células claramente necessitam de no mínimo um evento estocástico adicional, aparentemente uma mutação somática, antes que proliferem totalmente como células cancerosas. (Uma dica sobre a identidade deste terceiro evento estocástico veio de uma análise cuidadosa das células de rato que foram transformadas *in vitro* pelo protocolo *ras* + *myc*; mais cedo ou mais tarde, tais células normalmente adquirem uma mutação ou evento de metilação que leva à inativação da via supressora de tumores p53; veja o Capítulo 9.)

Note que as ações colaboradoras dos oncogenes transgênicos já foram mencionadas anteriormente, quando lemos sobre as ações sinérgicas dos oncogenes transgênicos *myc* e *bcl-2* na promoção da linfomagenese (veja a Figura 9.22). Nesse caso, a vantagem de *bcl-2* (e seu primo *bcl-x_L*) deriva amplamente dos seus efeitos antiapoptóticos. Isso ilustra o fato de que os oncogenes podem colaborar, por meio de uma variedade de mecanismos celulares fisiológicos, para promover a formação de um tumor (Tabela 11.2).

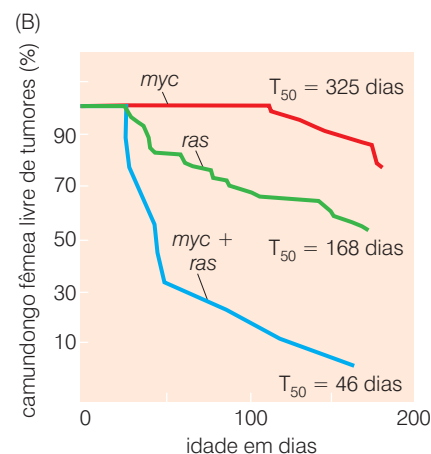
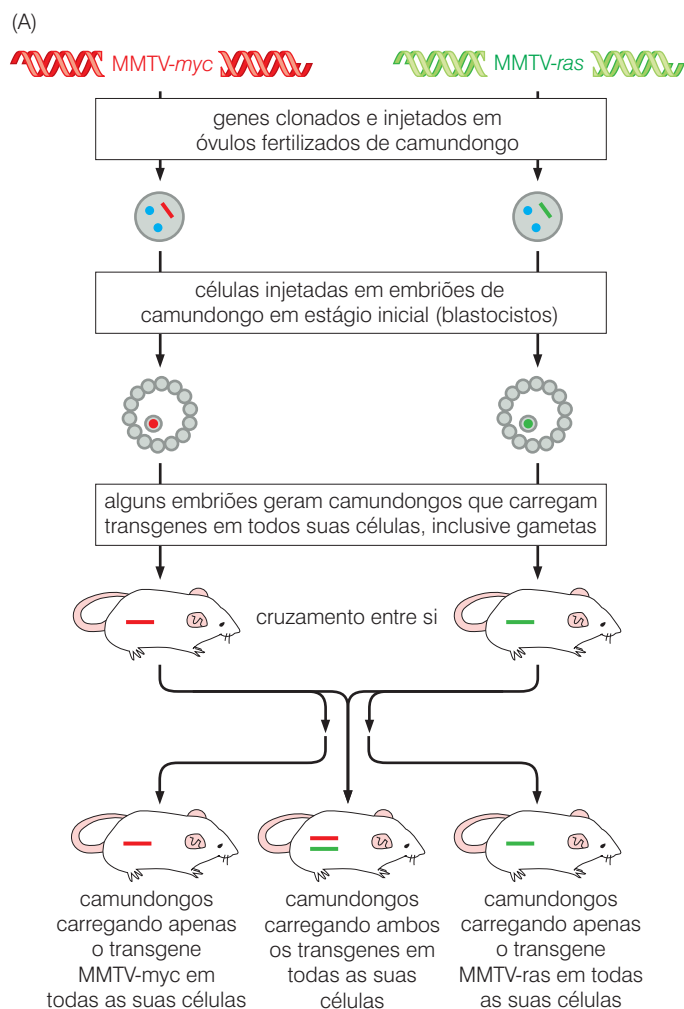


Figura 11.24 Colaboração de oncogenes em camundongos transgênicos propensos a câncer A habilidade de se criar camundongos transgênicos (veja a Figura 9.22A) tornou possível determinar se oncogenes são capazes de colaborar *in vivo* assim como *in vitro*. (A) Camundongos foram produzidos para carregar ou o transgene MMTV-ras ou o MMTV-myc em sua linhagem germinativa. O promotor transcricional MMTV (vírus de tumor mamário de camundongo) assegurou a expressão do transgene abundantemente em glândulas mamárias. Camundongos dessas duas linhagens transgênicas foram então cruzados para criar camundongos duplo-transgênicos que carregam ambos os transgenes (abaixo). (B) A incidência de carcinomas mamários em camundongos que carregam os transgenes MMTV-myc (curva vermelha) ou MMTV-ras (curva verde) nas suas linhagens germinativas foi acompanhada por muitos meses. Em adição, as duas linhagens de camundongos transgênicos foram cruzadas entre si para criar camundongos duplo-transgênicos, e os efeitos de ambos os transgenes sobre a incidência de tumores (curva azul) também foram rastreados. A porcentagem de camundongos livres de tumores (ordenada) é colocada no gráfico com relação à idade em dias de várias linhagens de camundongos. “ T_{50} ” indica o número de dias necessários para que a metade dos camundongos de um determinado genótipo desenvolva carcinomas mamários detectáveis. (De E. Sinn, W. Muller, P. Pattengale et al., *Cell* 49:465-475, 1987.)

11.12 As células humanas são construídas para serem altamente resistentes a imortalização e transformação

As lições biológicas derivadas do estudo de camundongos e ratos em geral são transferíveis diretamente para o entendimento de vários aspectos da biologia humana. Mesmo que 80 milhões de anos possam nos separar do ancestral comum mais recente, compartilhamos com os roedores a grande maioria dos atributos biológicos e bioquímicos desses distantes primos mamíferos que estão presentes de forma muito similar, se não idêntica, nos humanos. Os genomas de humanos e roedores também parecem bastante similares: essencialmente todos dos 20 mil genes descobertos no genoma humano têm ortólogos nos camundongos. É plausível que os processos biológicos de imortalização e transformação neoplásica sejam essencialmente idênticos em células de roedores e humanos.

A realidade biológica é, entretanto, relativamente diferente. É fácil imortalizar células de roedores simplesmente propagando-as através de um pequeno número de passagens *in vitro*. Espontaneamente, células imortalizadas com frequência surgem e se tornam progenitoras de linhagens celulares, como as células NIH 3T3, discutidas anteriormente. Em contraste, células humanas raramente, talvez nunca, se tornam imortalizadas seguindo uma sequência de passagens prolongada em cultura (veja o Capítulo 10). Finalmente, células humanas em cultura param de crescer e se tornam senescentes e, espontaneamente, clones de células imortalizadas não emergem.

Tentativas de transformar células experimentalmente têm mostrado diferenças entre espécies comparáveis no comportamento celular. Células primárias de roedores tornam-se transfor-

mas *in vitro* seguidas da introdução de pares de oncogenes (como *ras* e *myc*; Seção 11.10), enquanto esses pares de oncogenes introduzidos falham consistentemente em gerar células humanas tumorogênicas. De fato, as células humanas que emergem dessas co-transfecções não são nem imortalizadas e, portanto, entram em senescência mais cedo ou mais tarde.

Essas falhas repetidas na transformação celular preveniram os pesquisadores de abordar um problema simples, mas fundamental na biologia do câncer humano: quantos circuitos regulatórios intracelulares precisam ser perturbados para transformar uma célula humana normal em uma célula cancerosa? Análises das seqüências genômicas de células humanas cancerosas ajudaram pouco. Como discutido antes (Seção 11.7), células cancerosas derivadas de tumores humanos possuem um excesso de alterações genéticas, muito maior do que o relativamente pequeno número que participa da tumorogênese. Isso forçou os pesquisadores a considerar a transformação celular experimental como uma alternativa de abordar esse problema. Assim, eles perguntavam precisamente quantas mudanças genéticas precisavam ser introduzidas, experimentalmente, em células humanas para transformá-las.

A estratégia geral foi inspirada pela experiência com células cultivadas de roedores, que indicou que uma vez que as células eram imortalizadas em cultura, elas passavam a responder à transformação pelo oncogene *ras*. O fato de que a biologia do telômero de células de roedores e humanos difere completamente (Seção 10.9) parece explicar, pelo menos em parte, a dificuldade de se imortalizar células humanas e, assim, as suas diferentes respostas a oncogenes introduzidos. Lembre-se que as células de camundongo de laboratório geralmente carregam DNA telomérico extremamente longo (tão longo quanto 40 quilobases) e expressam, prontamente, níveis detectáveis da atividade enzimática da telomerase. De forma bastante contrastante, as células humanas normais têm telômeros muito menores, e a maioria dos tipos celulares humanos não tem atividade significativa da telomerase. Portanto, a imortalização de células humanas poderia ser facilitada adicionando-se o gene *hTERT* a outros oncogenes imortalizadores introduzidos nessas células.

De fato, a introdução de um gene *hTERT* em adição ao oncogene SV40 *large T* (cujo produto inativa as proteínas supressoras de tumor pRb e p53) realmente produz células humanas imortalizadas. (Meios alternativos de inativação de pRb e p53, como a introdução de oncogenes do papilomavírus humano *E6* e *E7*, funcionaram bem.) Uma vez que a imortalização foi alcançada por meio dessas mudanças, as células humanas resultantes puderam ser transformadas morfológicamente na placa de cultura introduzindo-se um oncogene *ras* ativado.

Essas células humanas transformadas morfológicamente não estavam, no entanto, totalmente transformadas, como indicado pela sua inabilidade em formar tumores quando implantadas em camundongos imunocomprometidos. (Os sistemas imunes não-funcionais de tais camundongos garantem que os tecidos de origem externa não sejam eliminados pelo ataque imunológico.) Essas células ainda requerem mais uma alteração, que é conseguida com a introdução do gene que codifica a oncoproteína SV40 “small T”. “Small T” afeta um subconjunto das funções de abundantes enzimas celulares conhecidas como fosfatase 2A (PP2A).

Juntos, esses experimentos demonstraram que cinco circuitos celulares regulatórios distintos precisam ser alterados experimentalmente antes que as células humanas possam crescer como células tumorais em camundongos imunocomprometidos (Figura 11.25). Essas mudanças envolvem (1) a via de sinalização mitogênica controlada por Ras (Capítulo 6), (2) o ponto de

Figura 11.25 Vias intracelulares envolvidas na transformação de células humanas A transformação experimental de células humanas tem sido conseguida por meio da inserção de várias combinações de genes clonados nas células. Inicialmente, a combinação de três genes codificando a oncoproteína SV40 “large T” (LT), a telomerase de hTERT e a oncoproteína SV40 “small T” (sT) foram suficientes para a transformação de uma variedade de tipos celulares humanos normais para o estado tumorogênico. Descobriu-se que esses genes desregulam cinco vias regulatórias distintas envolvendo (1) a sinalização mitogênica do Ras, (2) o controle do ciclo celular G₁ mediado pelo pRb, (3) a p53, (4) a manutenção do telômero e (5) a proteína fosfatase 2A (PP2A). O trabalho subsequente tem mostrado que outras combinações de genes clonados são suficientes da mesma forma. Por exemplo, a interrupção da função do pRb pode ser alcançada por uma combinação expressa ectopicamente, CDK4 resistente ao inibidor CDK + ciclina D1; o p53 pode ser interrompido por um alelo negativo dominante introduzido de p53; os telômeros podem ser mantidos por meio da combinação do SV40 LT + *myc*; e a função da PP2A pode ser interrompida pela construção shRNA que inibe a síntese da subunidade B56 da PP2A. É desconhecido se essas cinco vias são requeridas para transformação experimental de todos os tipos celulares humanos, e se a desregulação de todas essas cinco vias ocorre em tumores humanos que surgem espontaneamente.

via	Ras	pRb	p53	telômeros	PP2A
genes/agentes usados para desregular a via	<i>ras</i>	CDK4 + D1 SV40 LT HPV E7	DN p53 SV40 LT HPV E6	<i>hTERT</i> <i>myc</i> + SV40 LT	SV40 sT às vezes: <i>myc</i> <i>Akt/PKB</i> + <i>Rac1</i> <i>PI3K</i> B56 shRNA

Barra lateral 11.9 Os mesmos conjuntos de vias regulatórias precisam ser desregulados para criar todos os tipos de tumores humanos? Uma grande variedade de tipos celulares de humanos adultos normais pode ser transformada experimentalmente perturbando as cinco vias listadas na Figura 11.25. Incluídos nessas estão os fibroblastos; as células dos rins; células epiteliais de mama, próstata, ovário de pequenos trajetos de ar (pulmão); e astrócitos. Os requerimentos idênticos para transformação sugerem que um conjunto comum de vias bioquímicas deva ser desregulado em uma grande variedade de tipos celulares humanos para que a transformação tenha sucesso. (Cada uma dessas vias pode ser presumivelmente perturbada por meio de vários mecanismos genéticos e epigenéticos nos vários tipos de cânceres.)

Entretanto, é plausível que certas células humanas normais requeiram um maior ou menor número de mudanças antes de se tornarem transformadas. Por exemplo, vários cânceres pediátricos ocorrem tão cedo na vida que é difícil imaginar como as células desses tumores podem ter tido tempo suficiente para acumular um grupo de mutações (e

modificações epigenéticas) que parecem ser requeridas para a formação de várias malignidades adultas.

Isso sugere a possibilidade de que alguns cânceres pediátricos surjam diretamente de certos tipos de células embrionárias (p. ex., células-tronco), e que essas células embrionárias podem ser mais prontamente transformadas (por um número menor de alterações) do que as células que servem como precursoras dos tumores adultos. O caso extremo de um tipo celular embrionário é dado pelas células-tronco (ES) embrionárias que podem ser extraídas de embriões muito jovens. Células ES são, de todas as formas, geneticamente do tipo selvagem, e ainda são tumorigênicas (gerando teratomas) quando implantadas em hospedeiros singênicos. De fato, elas parecem ser o único exemplo de células do tipo selvagem que são tumorigênicas. Talvez algumas células dentro de embriões mais desenvolvidos requeiram, para sua transformação, diversas alterações genéticas que são intermediárias entre o número necessário para transformação de células ES (zero) e o número requerido para a transformação experimental de células adultas (cinco).

verificação do ciclo celular controlado por pRb (Capítulo 8), (3) a via de alarme controlada por p53 (Capítulo 9), (4) a via de manutenção do telômero controlada por hTERT (Capítulo 10) e (5) a via de sinalização controlada pela proteína fosfatase 2A.

Experimentos como esses fornecem claras indicações de por que as células humanas são altamente resistentes a transformação. Ao mesmo tempo, ainda não está claro se os passos requeridos para transformar experimentalmente as células humanas *in vitro* refletem, precisamente, as mudanças que células normais precisam passar dentro dos tecidos humanos antes de proliferarem com sucesso como células cancerosas. Claramente, quatro dessas mudanças (envolvendo a ativação de Ras e hTERT, inativação de pRb e p53) são comumente vistas em células de cânceres humanos. Entretanto, ainda não está claro se a quinta alteração – desregulação de um subconjunto de ações da PP2A – ocorre durante a formação de cânceres humanos que surgem espontaneamente. Além disso, ainda outras mudanças genéticas, não reveladas por esses experimentos, podem ser requeridas antes que as células dentro de certos tecidos humanos estejam aptas a gerar tumores clinicamente detectáveis. Esses experimentos também deixam outra questão não-resolvida: as regras genéticas e bioquímicas que governam a transformação humana são idênticas em todos os cânceres humanos (Barra lateral 11.9)?

Essas diferenças marcantes no comportamento de células humanas *versus* de camundongos requerem algum tipo de lógica biológica. De fato, já discutimos uma delas (Seção 10.9): as células de camundongo passam por cerca de 10^{11} mitoses durante o tempo de vida do camundongo, enquanto aquelas do corpo humano passam por cerca de 10^{16} ciclos celulares durante o tempo de vida humano. Em resposta aos sempre presentes perigos criados pela passagem através de cada ciclo celular, nossas células e tecidos têm sido guiados pela evolução para serem muito mais resistentes a transformação celular. Essa noção – na verdade uma especulação – ainda requer alguma validação e generalização. Por exemplo, as células do morcego da mamangaba e do musaranho etrusco (ambos com aproximadamente 2 g de peso corporal) e aquelas de uma baleia azul (de cerca de $1,3 \times 10^8$ g de peso corporal; Figura 11.26) requerem proporcionalmente menos ou mais alterações, respectivamente, antes de se tornarem cancerosas? (A diferença nas mitoses acumuladas ao longo do tempo de vida provavelmente são ainda maiores, uma vez que grandes mamíferos, geralmente, têm um tempo de vida até cem vezes mais longo do que os pequenos!)

As várias demonstrações experimentais da colaboração de oncogenes em células de humanos e de camundongos podem servir como bons modelos de como, de fato, a tumorigênese de múltiplas etapas ocorre no corpo humano. Assim, cada mutação (ou metilação



Figura 11.26 Tamanho corporal do mamífero e o risco relativo de transformação celular. Enquanto os tamanhos de células individuais são bastante comparáveis nas várias espécies de mamíferos, a massa corpórea geral e, portanto, os números de células, varia enormemente. Uma vez que a passagem através de cada ciclo celular cria o perigo de alterações genômicas, isso sugere que os riscos do câncer podem variar enormemente de uma espécie para outra. (A) O morcego da mamangaba da Tailândia, dito o menor mamífero, foi descoberto em 1973; ele pesa 1,5 g e tem uma envergadura de 15 cm. (B) A baleia azul tem um peso corporal de cerca de $1,3 \times 10^8$ g e um período de vida de cerca de 80 anos. A diferença da ordem de oito vezes na massa (e, portanto, no número de células) entre o morcego e a baleia junto com a diferença da ordem de 1,5 vezes no tempo de vida indicam uma diferença de um fator de 10^9 no número de divisões celulares que os dois organismos experimentam durante seu tempo de vida. (Uma vez que a taxa metabólica desse mamífero insetívoro pode ser 10^3 vezes mais alta que a da baleia, e uma vez que a carga mutacional do genoma celular deriva de subprodutos do metabolismo oxidativo, a baleia azul pode experimentar apenas um risco de 10^6 vezes maior que o do morcego.) (A, cortesia de Merlin D. Tuttle, Bat Conservation International; B, cortesia de Uko Gorter.)

gênica) mantida por uma população de células perturba ou desregula outra via de sinalização intracelular, até que todos os circuitos de controle chave tenham sido desorganizados. Uma vez que isso tenha acontecido, as células dessa população podem ser totalmente transformadas e, portanto, capazes de gerar o crescimento tumoral vigorosamente. Na verdade, análises do genoma de células tumorais humanas revelam resultados muito mais confusos, que são difíceis de conciliar como um esquema conceitual simples e satisfatório (Barra lateral 11.10).

Significativamente, as manipulações experimentais usadas para transformar células humanas para um estado tumorogênico normalmente geram células que formam massas de tumores primários localizados, tendo pequena ou nenhuma tendência (1) de se estender além dos seus limites e invadir tecidos próximos e (2) de espalhar metástases a regiões distantes. Portanto, análises das mudanças genéticas que são necessárias para tornar as células tumorogênicas não tratam da identidade dos genes e proteínas que programam os fenótipos malignos avançados e altamente agressivos, um assunto que confrontaremos apenas mais tarde, no Capítulo 14. Além disso, o cenário de cinco alterações sugerido pela transformação experimental de células humanas põe de lado um ponto crítico que discutiremos no próximo capítulo: a mutabilidade do genoma de células humanas é normalmente muito baixa, tornando pouco provável que populações de células nos nossos tecidos possam adquirir todas as mudanças genéticas necessárias para completar a progressão de um tumor dentro do período de vida humano.

Barra lateral 11.10 A genética dos tumores humanos verdadeiros confunde nosso entendimento de como a progressão do câncer ocorre. O esquema mais simples da progressão tumoral de múltiplas etapas define que cada passo sucessivo envolve, ainda, a interrupção ou a desregulação de outra via de sinalização celular chave. Por isso, cada um dos genes mutantes (ou metilados) encontrados no genoma de uma célula cancerosa humana deve afetar uma via regulatória distinta, e as mutações acumuladas no final da progressão tumoral devem colaborar uma com a outra para programar o crescimento neoplásico. De fato, a presente evidência genética geralmente conflita com tais opiniões.

Muitos genomas de carcinoma colorretal humano carregam mutações que levam à ativação da cinase PI3 e B-Raf, o que faz sentido, uma vez que essas duas mutações afetam vias complementares distintas que ficam *downstream* de Ras (Capítulo 6). No entanto, muitos outros tumores desse tipo têm mutações que ativam a cinase PI3 e Ras, o que não faz sentido, uma vez que se acredita que a oncoproteína Ras é capaz de ativar diretamente a cinase PI3; essas duas mutações, portanto, parecem ser, funcionalmente, mais propriamente redundantes do que complementares.

De forma contrária, mutações que se espera que colaborem umas com as outras, como aquelas afetando os genes *ras* e *p53*, em geral são mutuamente exclusivas. Assim, entre os carcinomas de cólon humano, alguns carregam mutações *ras*, enquanto outros carregam mutações *p53*; tumores carregando ambos são um pouco incomuns (o contrário à descrição inicial da via genética que leva a esses cânceres; veja a Seção 11.3). Similarmente, entre os carcinomas de bexiga humanos, esses tumores portando mutações que ativam o receptor do fator de crescimento de fibroblastos 3 (gerando um efeito similar à ativação do oncogene *ras*) raramente carregam mutações *p53* e vice-versa. Observações como essas são difíceis de conciliar com o nosso entendimento atual de como esses genes e proteínas codificadas operam – o que apenas diz que nossas percepções sobre essas questões irão, mais cedo ou mais tarde, requerer revisões substanciais.

11.13 Agentes não-mutagênicos, incluindo aqueles que favorecem a proliferação celular, fazem importantes contribuições para a tumorigênese

As observações clínicas e os resultados experimentais que vimos a respeito neste capítulo nos fornecem um quadro geral das modificações genéticas e epigenéticas requeridas para gerar uma célula cancerosa. Eles falham, entretanto, em revelar *como* essas mudanças são realmente adquiridas durante a progressão do tumor. Então agora daremos enfoque a esses problemas – os processos ocorrendo *in vivo* que permitem às células acumularem o grande número de alterações necessárias para formação tumoral.

Os esquemas descritos aqui ditam que uma sucessão de mudanças gênicas provê o maior estímulo para progressão tumoral. Visto que muitas dessas mudanças são causadas pelas ações de mutágenos, isso implica que a progressão do câncer é muito estimulada pelas transformações genéticas impostas por carcinógenos mutagênicos. Claro que precisamos revisar esse cenário para acomodar o evidentemente importante papel das mudanças epigenéticas, especificamente aquelas causadas pela metilação de promotores gênicos (veja a Seção 7.8). (No presente, não está claro se esses eventos de metilação são ativamente provocados por agentes externos ou ocorrem espontaneamente devido a erros eventuais ao acaso causados por proteínas celulares responsáveis pela regulação da metilação.)

Além das contribuições dos carcinógenos mutagênicos, claramente documentadas na indução do câncer (Seção 2.9), muitas evidências apontam para uma grande variedade de agentes *não-mutagênicos* que participam da formação do tumor. Indicações da importância de carcinógenos não-mutagênicos (às vezes chamados de **não-genotóxicos**) surgiram primeiramente de tentativas, no início dos anos 1940, de se desenvolver métodos efetivos para indução de cânceres de pele em camundongos. O modelo experimental usado nessas pesquisas dependia da exposição da pele do camundongo a constituintes altamente carcinogênicos do alcatrão, como o benzo[*a*]pireno (BP), o 7,12-dimetilbenz[*a*]antraceno (DMBA) ou o 3-metilcolantreno (3-MC; Figura 2.22). Por exemplo, o pincelamento diário com DMBA de um pequeno pedaço de pele de camundongos podia resultar em carcinomas de pele após vários meses desse tratamento.

Mas outro protocolo experimental provou ser mais revelador quanto aos mecanismos da indução de cânceres de pele. Logo após uma única aplicação com um agente como DMBA, a mesma área da pele poderia ser tratada semanalmente com um segundo agente, chamado TPA (12-*O*-tetradecanoilforbol-13-acetato; Figura 11.27), um irritante de pele preparado a partir de sementes de crôton. (Outro termo geralmente usado para TPA é PMA, forbol-12-meristato-13-acetato). A aplicação repetida de TPA na área tratada com DMBA resultou no aparecimento de papilomas após 4 a 8 semanas, dependendo da linhagem de camundongo usada (Figura 11.28A-C). (Esses papilomas são, de várias maneiras, análogos aos adenomas observados nos estágios iniciais de progressão do câncer do cólon.)

A princípio, a sobrevivência e o crescimento desses papilomas de pele dependiam da aplicação contínua de TPA, uma vez que a interrupção do tratamento causava o regresso do papiloma (Figura 11.28E). Entretanto, se o tratamento com TPA era continuado por várias semanas, papilomas independentes de TPA finalmente surgiam, que não regressariam após a parada do tratamento com TPA e, em vez disso, persistiram por extensos períodos (Figura 11.28F). Alguns desses papilomas independentes de TPA podem, com baixa probabilidade, evoluir para carcinomas de pele de células escamosas malignos após cerca de seis meses.

Na ausência do tratamento inicial com DMBA, no entanto, a aplicação repetitiva de TPA falhou em provocar papilomas ou carcinomas (Figura 11.28B). Ainda mais interessante, uma área da pele pode ser tratada uma vez com DMBA e depois deixada em descanso por um ano. Se essa porção da pele for tratada depois com uma série de aplicações de TPA (como na Figura 11.28C), ela “lembraria” de ter sido exposta previamente ao DMBA e responderia formando um papiloma.

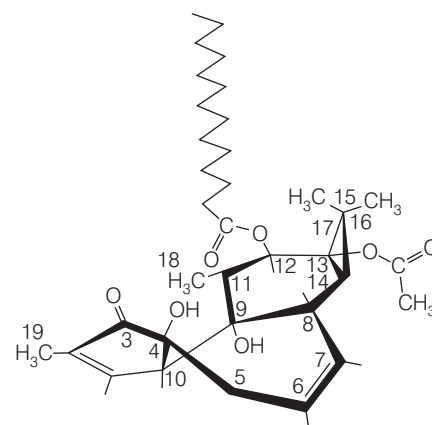
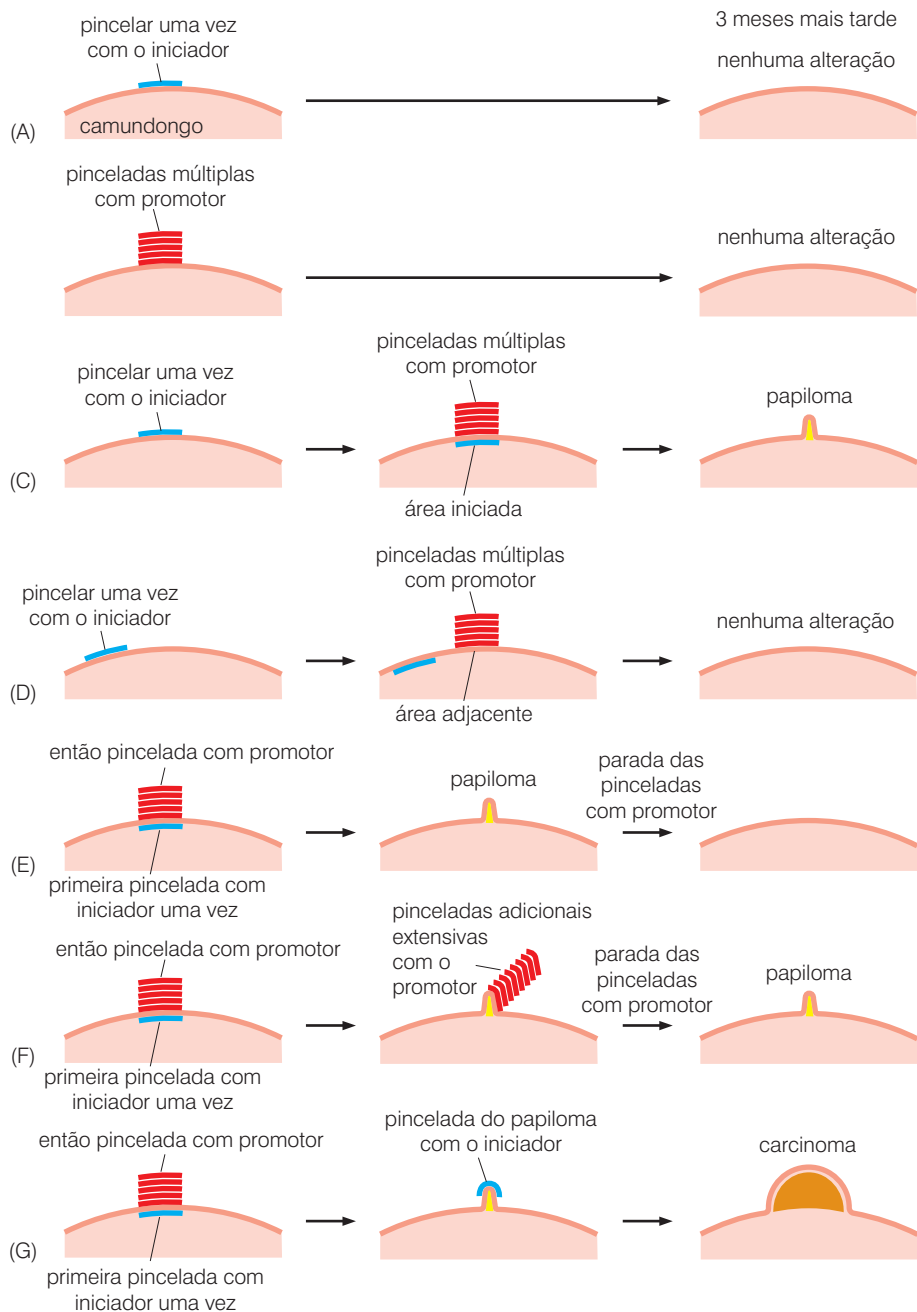


Figura 11.27 TPA, um importante promotor de tumorigênese de pele A estrutura estereoquímica do 12-*O*-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA), também conhecido como forbol-12-meristato-13-acetato (PMA), é mostrada aqui. TPA é extraído da planta crôton (*Croton tiglium*). Seu alvo nas células é a proteína cinase $C\alpha$ (PKC α).

Figura 11.28 Protocolos para indução de carcinomas de pele em camundongos. A indução de carcinomas de pele pela aplicação de carcinógenos nas costas de camundongos requer certas combinações de tratamentos com iniciadores e promotores. (A) Um tratamento único com o carcinógeno iniciador, como o DMBA (dimetilbenzo[a]antraceno), não leva a carcinomas de pele até três meses depois. (B) Tratamentos múltiplos com agentes promotores, como o TPA (Figura 11.27), também não levam a números significativos de tumores. (C) Se uma área da pele é pincelada uma vez com um agente iniciador seguido de pinceladas repetitivas com um agente promotor, um papiloma irá, geralmente, aparecer vários meses depois. (D) Se uma área da pele é pincelada uma vez com um agente iniciador e um agente promotor for usado depois para pincelar repetidamente outra porção da pele próxima, mas não sobreposta à primeira, nenhum papiloma será visto três meses depois. (E) Uma variação do protocolo descrito no painel C; um iniciador como o DMBA é aplicado seguido de tratamentos repetitivos com TPA, o que leva a papilomas. No entanto, se pinceladas repetidas com o agente promotor de tumor TPA são interrompidas logo após aparecerem os papilomas, eles regredem, indicando que eles são dependentes da estimulação contínua do promotor. (F) Em outra variação do protocolo descrito no painel C, a pincelada com promotor TPA pode ser continuada por vários meses após o aparecimento dos primeiros papilomas. Depois disso, a pincelada de TPA pode ser interrompida. Sob essas condições, alguns dos papilomas persistirão, indicando que eles se tornaram independentes da estimulação contínua do promotor. (G) Se um papiloma é produzido pelos protocolos dos painéis C e F e o papiloma é depois tratado com um agente iniciador, um carcinoma pode aparecer, mesmo na ausência de mais um tratamento com o promotor.



Esses fenômenos foram ponderados como segue (Figura 11.29). Um único tratamento por um **agente iniciador** (ou **inicializador**) como DMBA deixou um sinal estável e de longa duração em uma célula ou em um agrupamento de células; esse sinal era aparentemente algum tipo de alteração genética. Exposições repetidas subsequentes dessas células "inicializadas" ao TPA (chamado de **agente promotor** ou simplesmente **promotor**) permitiram que elas proliferassem vigorosamente sem que houvesse efeito aparente em células não-inicializadas próximas. (Note que o uso da palavra "promotor" nesse contexto não está relacionado com o seu outro significado – a saber, as sequências de DNA que controlam a transcrição de um gene.) A proliferação localizada de células inicializadas estimulada pelo promotor produziria finalmente um papiloma. No entanto, como mencionado, se a aplicação de TPA fosse descontinuada, o papiloma poderia desaparecer. Da mesma forma, os efeitos do promotor eram reversíveis, sugerindo que ele exercia um efeito *não-genético* nas células do papiloma. Claramente, esse efeito não-genético, qualquer que seja sua natureza, poderia colaborar com a alteração genética aparentemente criada pelo iniciador para dirigir a proliferação de células.

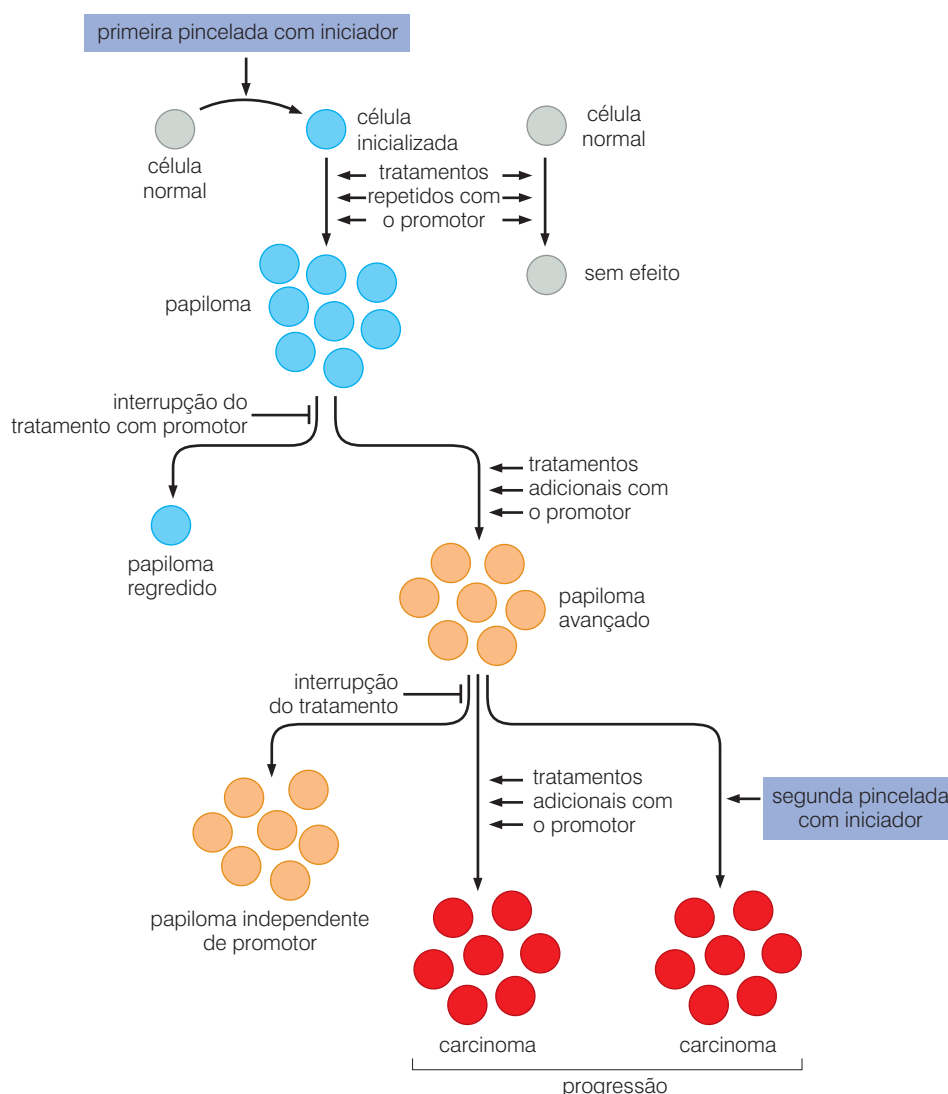


Figura 11.29 Esquema da iniciação e promoção de carcinomas de epiderme em camundongos. As observações da Figura 11.28 podem ser ponderadas como descrito aqui. O agente iniciador converte uma célula normal (cinza, acima, à esquerda) em uma mutante, célula inicializada (azul). O tratamento repetido das células inicializadas com o promotor TPA gera um papiloma (agregado de células azuis), enquanto o tratamento com TPA de células adjacentes normais (cinza, acima, à direita) não têm efeito. O tratamento adicional do papiloma formado inicialmente pode ser interrompido (esquerda, no centro), e, nesse caso, o papiloma regride. Alternativamente, o tratamento adicional repetitivo do papiloma formado inicialmente pode gerar um papiloma mais avançado (células alaranjadas), o qual persiste mesmo depois que o tratamento com promotor é interrompido (esquerda, abaixo); o tratamento repetitivo adicional desse papiloma mais avançado com TPA finalmente gera, com baixa frequência, um carcinoma (no centro, abaixo, células vermelhas). Alternativamente, a exposição do papiloma formado inicialmente a um segundo tratamento pelo agente iniciador gera células duplamente mutantes que também formam um carcinoma (abaixo, à direita, células vermelhas).

Como vimos anteriormente, se as células inicializadas forem tratadas com o promotor TPA por muitos meses, finalmente, alguns papilomas podem evoluir e se tornar independentes de TPA; nesse caso, mesmo depois da retirada do TPA, os papilomas continuaram a aumentar em tamanho e alguns, finalmente, desenvolveram-se em carcinomas de pele. Essa mudança permanente no comportamento celular pareceu refletir as ações de uma segunda alteração independente da genética. De fato, a evolução para um estado carcinomatoso poderia ser acelerada fortemente tratando-se o papiloma com uma segunda dose do agente iniciador, já suspeito de ser um mutagênico (veja a Figura 11.29). Esse terceiro passo na tumorigênese (vindo depois da iniciação e promoção) é chamado de **progressão**; o termo é usado de forma mais genérica, por todo este livro e em outros locais, para indicar a evolução de células para um estado de crescimento maligno ampliado.

Quatro décadas após o desenvolvimento do protocolo de indução de câncer de pele de camundongo, a identidade dos genes e proteínas que são os atores principais na tumorigênese de pele foi descoberta (Figura 11.30). Como suspeitado há longo tempo, o DMBA usado como agente iniciador é de fato um potente mutagênico no contexto da carcinogênese de pele. (Como suporte a essa conclusão, veja a Barra lateral 11.11.) Como é um mutagênico que age ao acaso, o DMBA cria uma grande variedade de mutações nos genomas das células expostas. No entanto, os tumores de pele que aparecem invariavelmente carregam mutações pontuais nos oncogenes *H-ras*, indicando que esse alelo mutante em particular confere uma forte vantagem seletiva nas células da pele.

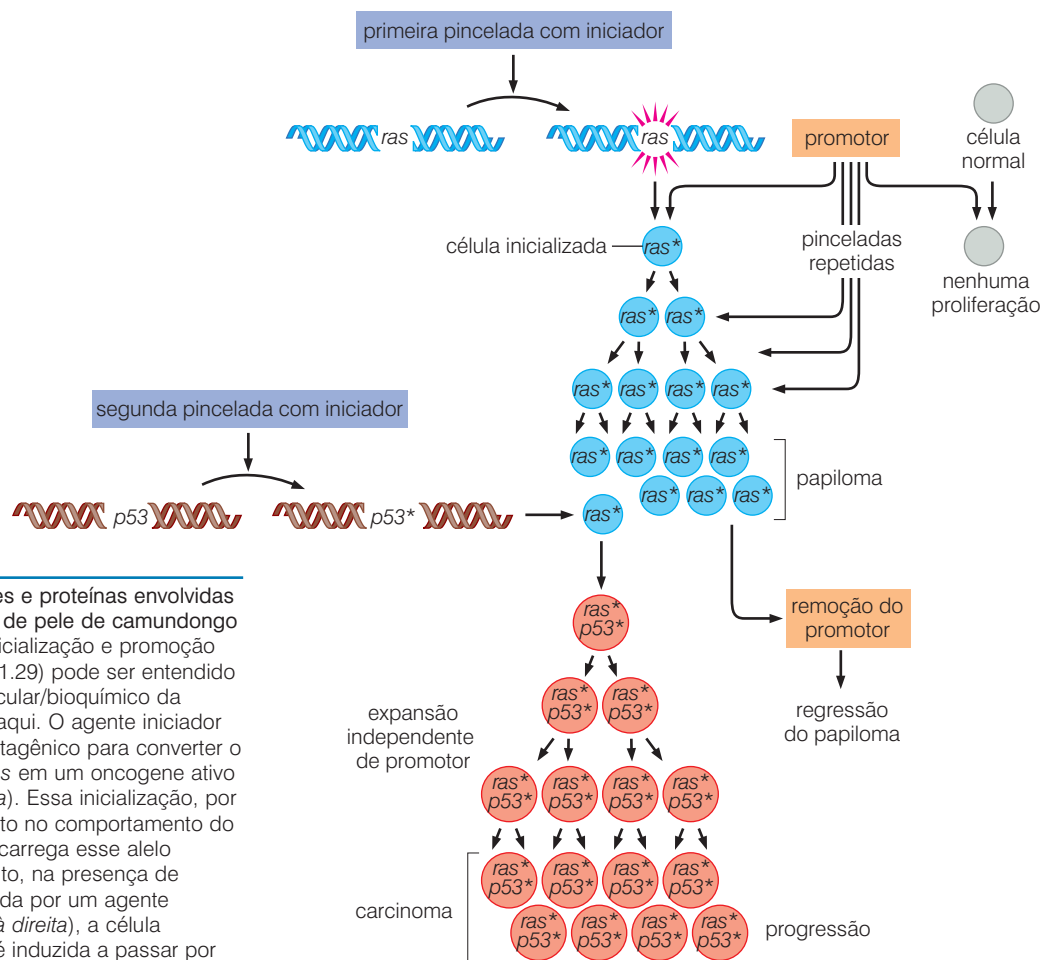


Figura 11.30 Genes e proteínas envolvidas na carcinogênese de pele de camundongo. O fenômeno da inicialização e promoção (Figuras 11.28 e 11.29) pode ser entendido em um nível molecular/bioquímico da maneira ilustrada aqui. O agente iniciador atua como um mutagênico para converter o proto-oncogene *ras* em um oncogene ativo (acima, à esquerda). Essa inicialização, por si só, não tem efeito no comportamento do queratinócito que carrega esse alelo mutante. No entanto, na presença de estimulação repetida por um agente promotor (acima, à direita), a célula carregando o *ras* é induzida a passar por repetidos ciclos de crescimento e divisão, levando à formação de um papiloma (células azuis). De forma contrária, uma célula sem o oncogene *ras* (cinza, acima, à direita) não é estimulada pelo agente promotor e, assim, não se divide em resposta à exposição repetida a esse agente. Se o tratamento repetitivo por esse promotor é interrompido (abaixo, à direita), o papiloma regride. No entanto, se o papiloma é exposto uma segunda vez a um agente iniciador mutagênico (esquerda), uma segunda lesão genética, geralmente envolvendo a mutação do gene supressor de tumor *p53*, é criada. Esse alelo *p53* mutante colabora com o oncogene *ras* para criar uma população de células (laranja-claro) que não depende mais do promotor e são capazes de formar um carcinoma.

Tratamentos subsequentes repetitivos com TPA, o agente promotor, agem sinergeticamente com os oncogenes H-*ras* ativados para dirigir a proliferação de células contendo oncogenes, resultando em um papiloma. O tratamento de um papiloma com TPA por um período extenso pode gerar um papiloma que pode persistir, mesmo após o final do tratamento com TPA. Alternativamente, se as células do papiloma são expostas mais uma vez a um agente iniciador como o DMBA, esse papiloma pode progredir para um carcinoma, cujas células agora carregam, além do oncogene H-*ras*, um gene *p53* mutante.

Se fôssemos descrever esses fenômenos em um nível bioquímico de transdução de sinal (Figura 11.31), poderíamos dizer que o promotor TPA funciona como um potente estimulador da proliferação celular por meio de sua habilidade em ativar a cinase celular serina/treonina conhecida como proteína cinase C α (PKC- α), a qual encontramos precocemente em um contexto da transdução de sinal no citoplasma. Mais especificamente, o TPA age como um imitador funcional do diacilglicerol (DAG), a molécula que é gerada endogenamente pelas células como um meio de ativação da proteína cinase C (PKC; Figura 6.16). Veremos alguns dos efetores *downstream* da PKC- α mais tarde neste capítulo. De alguma forma, os efetores *downstream* da PKC- α colaboram com o oncogene H-*ras*, de maneira ainda desconhecida, para dirigir a proliferação de queratinócitos inicializados cujos descendentes formam papilomas e, em raras ocasiões, progridem formando carcinomas. Essas diversas observações da carcinogênese de pele de camundongo (Figuras 11.28, 11.29 e 11.30) levam-nos a concluir que promotores de tumor como o TPA, o qual não afeta diretamente os genomas das células, podem, contudo, funcionar como importantes agentes dirigindo o avanço da tumorogênese de múltiplas etapas.

Barra lateral 11.11 Análises moleculares mostram que a inicialização é causada diretamente pelas ações mutagênicas de um carcinógeno iniciador A conveniência experimental do modelo de carcinogênese de pele de camundongo tem tornado possível validar diretamente algumas especulações mecanísticas feitas aqui. Por exemplo, a introdução de um oncogene *H-ras* em células da pele de camundongo por meio do uso de um vetor retroviral cria células que imitam muito bem o comportamento de células inicializadas pelo DMBA, no sentido de que elas respondem aos efeitos subsequentes do promotor TPA aplicado. Esse resultado demonstra que a criação de um oncogene *H-ras* por um agente iniciador é suficiente, por si só, para gerar uma célula inicializada.

O modelo de carcinogênese de pele de camundongo ainda levanta outras questões: os agentes iniciadores carcinogênicos, como os carcinógenos DMBA ou 3-metilcolantreno (3-MC), atuam diretamente no proto-oncogene *H-ras* para criar um oncogene? Ou eles o fazem indiretamente estimulando as ações de algumas moléculas intermediárias que são depois responsáveis por reagir com o DNA, criando as mutações críticas inicializadoras?

Quando os tumores de pele de camundongo foram inicializados pela exposição a um dos dois carcinógenos alquilantes (Capítulo 12),

N-metil-*N*-nitro-*N*-nitrosoguanidina (MNNG) ou *N*-metilnitrosourea (MNU), os tumores de pele resultantes apresentaram apenas **transições** G para A (i. e., substituições purina-purina ou pirimidina-pirimidina) no códon 12 do gene *H-ras*. Em contraste, quando os tumores de pele de camundongo eram inicializados picelando-se com 3-metilcolantreno (3-MC), as células do papiloma e carcinoma resultantes carregavam, predominantemente, **transversões** G para T (substituições purina-pirimidina ou vice-versa) no códon 13 e transversões A para T no códon 61 do gene *H-ras*. O dimetilbenzoantraceno (DMBA), o qual reage com as As, induziu tumores com transversões A para T nesse gene. Essas substituições desses nucleotídeos estão de acordo com as atividades mutagênicas conhecidas desses carcinógenos.

Visto que as substituições específicas de base refletem a identidade química dos agentes iniciadores, essas observações fornecem fortes evidências das interações químicas diretas entre as moléculas do carcinógeno iniciador e as bases específicas presentes no proto-oncogene *H-ras* das células da pele de camundongo. Além disso, quando consideradas juntas com os efeitos observados do retrovírus *H-ras* vetor, elas indicam que a principal contribuição mutacional desses agentes à inicialização tumoral deriva da sua habilidade em mutar o proto-oncogene *H-ras*.

11.14 Agentes tóxicos e mitogênicos podem atuar como promotores de tumor humano

O modelo experimental da carcinogênese de pele de camundongo é útil para ilustrar os princípios da inicialização, promoção e progressão tumoral. No entanto, não nos diz praticamente nada sobre como mecanismos análogos operam no corpo humano para criar o câncer. De fato, um diverso arranjo de mecanismos bioquímicos e biológicos parece ser responsável pela promoção do tumor levando aos cânceres humanos. Entre eles, estão os mecanismos que atuam de maneira tóxica ou mitogênica em vários tecidos humanos.

Um exemplo notável dos mecanismos citotóxicos na promoção de tumores humanos é dado por cânceres da garganta e da boca (comumente chamados de cânceres da cabeça e do pescoço). Esses carcinomas são comumente encontrados em fumantes de cigarros que também são consumidores de bebidas alcoólicas destiladas. De fato, o hábito de fumar intensamente junto com o freqüente consumo de álcool destilado leva a um aumento de cem vezes no risco de certos tipos de cânceres da cabeça e do pescoço.

A fumaça do cigarro é rica em uma variedade de carcinógenos mutagênicos, incluindo o 3-metilcolantreno(3-MC). O etanol, em contraste, tem um fraco, se é que tem algum, poder mutagênico. A contribuição das bebidas alcoólicas destiladas na indução de tumores parece derivar de seus efeitos tóxicos nas células epiteliais que revestem a boca e garganta. Depois da exposição a uma bebida contendo uma alta porcentagem de etanol, muitas dessas células morrem e desprendem-se. Células-tronco subjacentes ao epitélio respondem dividindo-se para regenerar a camada celular epitelial da boca e da garganta. Enquanto essas células-tronco podem normalmente se dividir em uma taxa baixa e fixa, sua taxa mitótica aumenta substancialmente após uma vasta **descamação** do epitélio pelo etanol.

As células da boca e da garganta, cuja proliferação é estimulada pelo álcool, podem já carregar alelos mutantes induzidos pelo alcatrão do tabaco. O efeito promotor do álcool causa, em seguida, a expansão clonal dessas células inicializadas e pode, por meio disso, permitir que suas descendentes adquiram ainda outras mutações que levam, finalmente, aos cânceres clinicamente agressivos de cabeça e pescoço. Isso representa uma ilustração dramática de um agente tóxico atuando como um promotor tumoral.

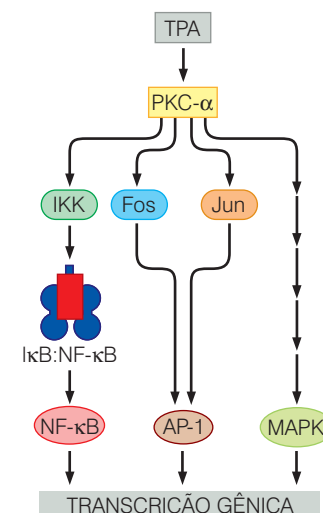


Figura 11.31 Ativação de Fos, Jun e NF-κB pelo PKC-α. O mecanismo preciso pelo qual o oncogene *ras* ativado atua sinergicamente com a proteína cinase C (PKC-α) ativada pelo TPA para dirigir a proliferação dos queratinócitos é pouco entendido. Está claro que, uma vez que a PKC-α é ativada pela ligação com o TPA, ela é capaz de estimular a transcrição de diversas vias de sinalização distintas, incluindo aquelas envolvendo os fatores de transição NF-κB e AP-1 e a enzima ERK/MAPK. Essas alterações bioquímicas ainda não deram uma explicação clara de por que o TPA estimula a proliferação dos queratinócitos inicializados carregando o oncogene *ras* enquanto tem um efeito mínimo nos queratinócitos selvagens próximos.

Barra lateral 11.12 Uma rara síndrome de câncer ilustra a importância da proliferação celular na progressão tumoral. A síndrome de Kostmann é uma síndrome hereditária rara caracterizada pela quase completa ausência de **neutrófilos**, as células do sangue que são responsáveis por matar agentes infecciosos bacterianos e fúngicos. Na forma autossômica dominante da doença, o defeito genético que induz a síndrome causa a síntese de uma elastase (uma protease) mutante específica de neutrófilos – uma enzima que é normalmente expressa em níveis aumentados nos neutrófilos conforme eles se diferenciam. A elastase mutante presente nos pacientes com Kostmann é citotóxica para seus neutrófilos e, assim que se expressa em níveis significativos nessas células, ela causa sua diminuição por meio da apoptose (Figura 11.32). Células-tronco mielóides progenitoras na medula respondem à **neutropenia** (diminuição do número de neutrófilos no sangue) resultante proliferando e tentando repor o conjunto de neutrófilos diferenciados. Isso leva a ciclos fúteis intermináveis de proliferação de células-tronco, uma vez que todas as tentativas para a produção de neutrófilos por essas progenitoras são frustradas pela morte rápida induzida pela elastase dessas células conforme se diferenciam. Em alguns pacientes, como uma consequência da proliferação excessiva e contínua dessas células-tronco por muitos anos, surgem leucemias mielógenas agudas a partir da população de células tronco mielóides. Essa síndrome fornece um dramático exemplo de como um agente citotóxico (nesse caso, um de origem endógena) funciona diretamente como um promotor tumoral.

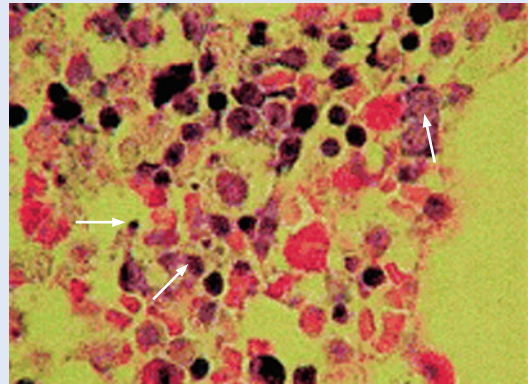


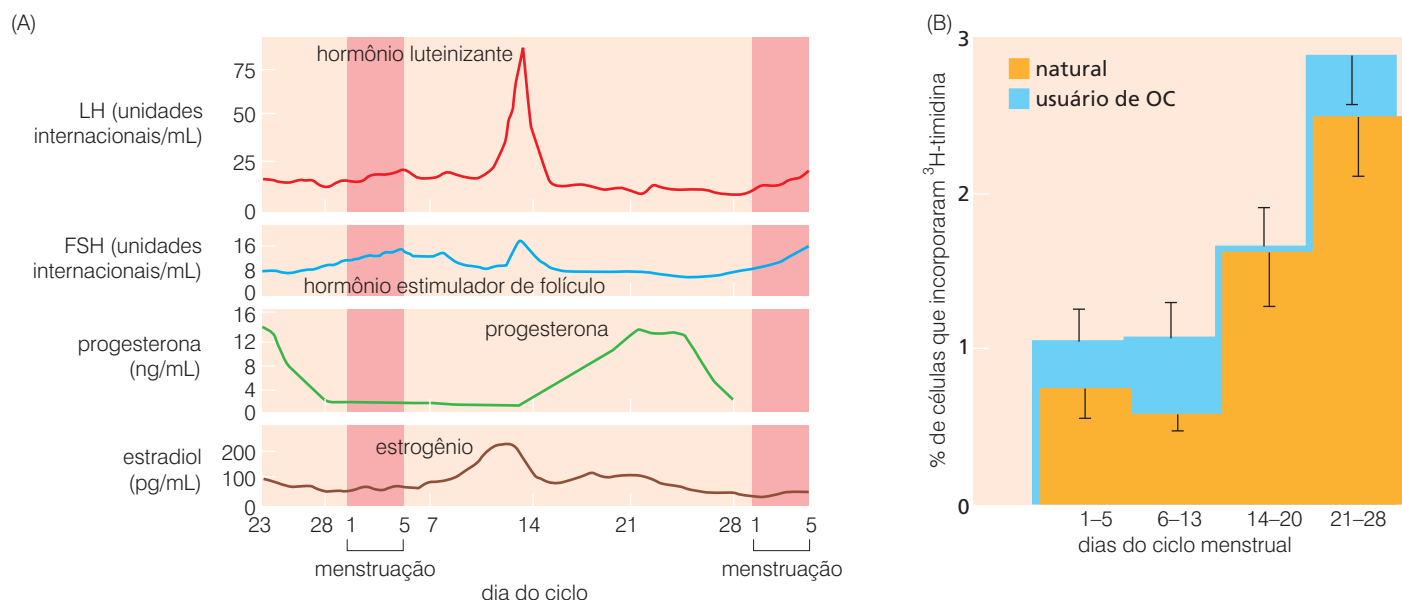
Figura 11.32 Síndrome de Kostmann Essa doença é manifestada pela perda progressiva de células precursoras de neutrófilos em diferenciação a partir da medula óssea, como revelado aqui pelas setas brancas que apontam para um grande número de corpos apoptóticos, isto é, fragmentos de células que resultam do acionamento de seus programas apoptóticos. Essa apoptose é atribuída, por sua vez, à síntese de uma variante mutante tóxica da enzima elastase. (De G. Carlsson, A.A. Aprikyan, R. Tehranchi et al., *Blood* 103:3355-3361, 2004.)

Imagine, de forma mais geral, compostos que são altamente tóxicos para certas populações de células de um tecido. Esses agentes citotóxicos podem funcionar como promotores de tumor simplesmente causando a proliferação de células que tenham sobrevivido aos efeitos tóxicos desses agentes. Certos tipos de cânceres humanos ilustram muito bem o papel da citotoxicidade na progressão de um tumor (veja a Barra lateral 11.12).

De fato, agentes mitogênicos podem também funcionar como promotores de tumor. Proeminente entre eles, estão os hormônios esteróides – estrogênio, progesterona e testosterona. No corpo feminino, por exemplo, o estrogênio e a progesterona estão envolvidos na programação da proliferação das células dos tecidos reprodutivos. Os ciclos menstruais mensais das mulheres entre a **menarca** e a menopausa resultam na proliferação e depois regressão das células que formam os epitélios dos ductos da glândula mamária (Figura 11.33). O revestimento endometrial do útero passa por ciclos similares de proliferação e regressão.

A epidemiologia mostra claramente que quanto maior o número de ciclos menstruais durante o tempo de vida de uma mulher, maior o risco de câncer de mama. Por estimativa, o risco do câncer de mama durante a vida decresce em 20% para cada ano de atraso da menarca durante a adolescência. (A ilustração mais completa da importância da periodização da menarca vem de estudos de gêmeas idênticas ou monozigóticas, em que ambas, finalmente, desenvolveram câncer de mama; a gêmea cuja menarca começou antes teve um risco 5,4 vezes maior de ser a primeira a ser diagnosticada com a doença.) Mulheres que param de menstruar antes da idade de 45 anos têm apenas metade do risco de desenvolver câncer de mama em relação àquelas que continuam menstruando até os 55 ou além.

A remoção dos ovários, a primeira fonte de estrogênio para o corpo feminino, causa forte declínio do risco do câncer de mama. Reforçando essa observação, estão os resultados de um estudo holandês, o qual mostrou que mulheres que entram na menopausa antes da idade de 36 anos, devido aos efeitos colaterais da quimioterapia para o linfoma de Hodgkin, têm decréscimo de 90% do risco subsequente de desenvolver câncer de mama. Ao contrário, mulheres na pós-menopausa que contraem câncer de mama têm em média um nível de estrogênio circulante 15% maior do que mulheres não-afetadas.



Os efeitos do estrogênio no câncer de mama são certamente complexos e parece que esse hormônio atua em outras células na glândula mamária além das epiteliais. Até agora, é evidente que o estrogênio, e talvez outros hormônios, como a progesterona e mesmo a prolactina, periodicamente induzam a proliferação celular de forma a permitir a progressão de células epiteliais mamárias inicializadas (MECs) em MECs encontradas em vários tipos de cânceres de mama. (Alguns pesquisadores têm argumentado que os metabólitos do estrogênio são mutagênicos e que contribuem para o desenvolvimento do câncer de mama; se assim for, os efeitos mutagênicos do estrogênio no desenvolvimento do câncer de mama são certamente ofuscados pelo seu poder de promover a proliferação de MECs.)

Nesse exemplo, confrontamos um promotor de tumor que é endógeno do corpo de um mamífero, e não um agente de origem externa. Entretanto, as ações desse hormônio são bastante próximas das propriedades dos clássicos promotores de tumor.

11.15 Inflamações crônicas muitas vezes promovem a progressão de tumores em camundongos e humanos

Relativamente poucos promotores de tumores humanos atuam puramente por meio de mecanismos citotóxicos ou mitogênicos, como aqueles descritos na Seção 11.14. Em vez disso, a grande maioria parece dirigir a expansão clonal por meio de mecanismos envolvendo a inflamação. Sinais disso vêm de modelos da inicialização e promoção de tumores de pele de camundongos (Seção 11.13). Esse modelo experimental é claramente artificial, no sentido de que envolve um promotor (TPA) que está raramente, se é que alguma vez, envolvido com o desenvolvimento de tumores de pele em mamíferos. Entretanto, ele ensina uma lição generalizável importante sobre a promoção tumoral: O TPA foi inicialmente escolhido por ser irritante para pele de camundongos e assim induzir inflamação localizada.

Um diverso grupo de outras observações dá peso à noção de que a inflamação está comumente envolvida na promoção de tumores. Por exemplo, quando uma linhagem de células de um adenoma de cólon humano foi implantada subcutaneamente em camundongos nus, elas eram não tumorigênicas. No entanto, quando foram introduzidas em um camundongo hospedeiro junto com um fragmento de plástico (ao qual foram fixadas), uma inflamação localizada do estroma foi induzida pelo plástico, e as células do adenoma cresceram para formar

Figura 11.33 Flutuação nos níveis de hormônio, proliferação celular e morfologia das glândulas mamárias durante o ciclo menstrual. A estimulação periódica da proliferação das células epiteliais mamárias humanas sobre o controle de hormônios como a progesterona, a prolactina e o estrogênio (estradiol) parece estar ligada ao aumento do risco de desenvolvimento de câncer de mama. (A) Como visto aqui, os níveis de vários desses hormônios variam dramaticamente ao longo do ciclo menstrual. (B) O ciclo periódico mensal leva a fortes flutuações na taxa de proliferação das células. Aqui, a porcentagem de células incorporando timidina tritiada em uma biópsia de tecido é colocada em um gráfico em função dos dias do ciclo menstrual. O uso de contraceptivos orais (OC) tem efeito mínimo nas taxas de síntese do DNA. (A, de R.A. Rhoads and R.H. Planzer, *Human Physiology*. Philadelphia: W.B. Saunders, 1996; B, de T.J. Anderson, S. Battersby, R.J. King et al., *Hum. Pathol.* 20:1139-1144, 1989.)

tumores. O fenótipo tumorogênico dessas células persistiu mesmo depois de elas serem subsequentemente transplantadas (sem o plástico) para outro animal hospedeiro, indicando que sua proliferação neoplásica era agora dirigida por alguma alteração genética ou epigenética estável. Outras observações do desenvolvimento de tumores do trato gastrointestinal de camundongos dão suporte ao argumento de que a inflamação é um componente central importante na carcinogênese de cólon (Barra lateral 11.13).

A inflamação crônica também tem um papel claro na patogênese de carcinomas humanos. Por exemplo, aqueles surgindo na vesícula biliar estão geralmente associados a décadas de histórico de cálculos na vesícula e resultante inflamação do revestimento epitelial da vesícula biliar (Figura 11.35A). De forma similar, carcinomas hepatocelulares (HCCs), que são comuns no leste asiático (Barra lateral 11.14), estão associados a infecções crônicas pelo vírus da hepatite B (HBV) e acompanhadas por inflamação do fígado (Figura 11.35B, *painel à*

Barra lateral 11.13 A inflamação contribui para a carcinogênese no trato gastrointestinal Um exemplo dramático do papel da inflamação na formação do carcinoma de cólon vem do estudo de camundongos mutantes que não produzem a TGF- β 1. Tais camundongos tendem a desenvolver uma doença auto-imune, a qual resulta na sua morte após algumas semanas. A fim de poupar esses camundongos, o seu sistema imune foi incapacitado pela inativação das cópias do gene *Rag2* na linhagem germinativa (veja a Barra lateral 7.10), uma perda que previne a formação de linfócitos antígeno-específicos que ativam a doença auto-imune. Os camundongos duplo-mutan-

tes (TGF- β 1^{-/-} *Rag2*^{-/-}) agora sobrevivem, mas desenvolvem área de inflamação no cólon, assim como adenomas e adenocarcinomas de cólon, entre a idade de 3 a 6 semanas. No entanto, quando esses camundongos duplo-mutantes foram criados em ambiente livre de germes (o qual permite que o cólon fique livre de populações bacterianas), nenhuma inflamação de cólon foi observada e nenhum adenocarcinoma se desenvolveu.

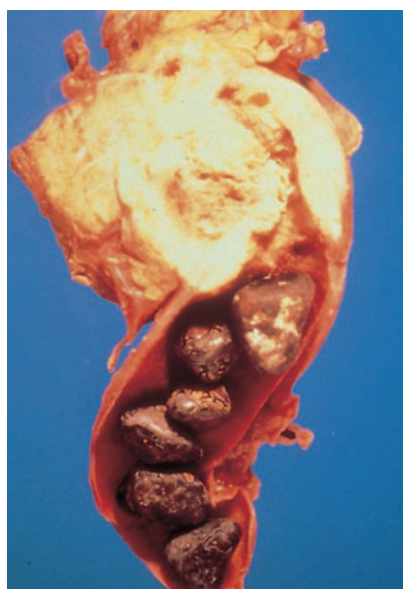
Se esses camundongos livres de germes forem introduzidos em recintos de animais nos quais *Helicobacter hepaticus* (uma bactéria que comumente habita o cólon de camundongo) estava presente, mais uma vez pólipos e carci-

nomas são formados nos seus cólons (Figura 11.34A, B). Tais observações indicam que a flora bacteriana do intestino contribui de forma importante para a inflamação em ambos os camundongos e, pode-se imaginar, em humanos sofrendo de colite ulcerativa, uma condição inflamatória que predispõe ao câncer de cólon (p. ex., veja a Figura 10.36). Além disso, resultados como esses sugerem, por outro lado, que áreas localizadas de inflamação do cólon em indivíduos normais podem também contribuir para o aumento do risco de formação de pólipos adenomatosos que, finalmente, podem progredir para carcinomas.

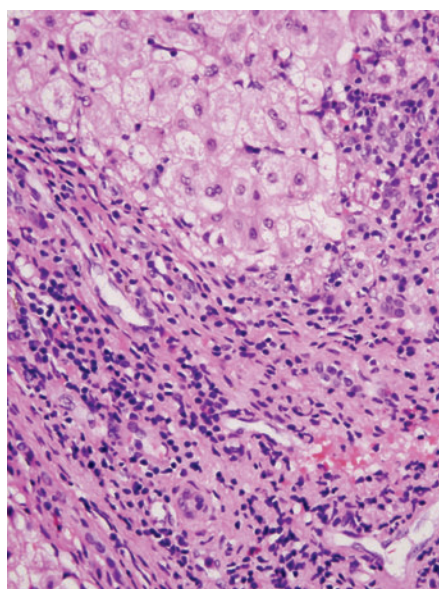


Figura 11.34 Inflamação do cólon e a promoção tumoral O desenvolvimento de adenomas e carcinomas no cólon é fortemente dependente da inflamação crônica que ocorre nesse órgão. Assim, camundongos alterados geneticamente para não produzirem a TGF- β 1 sucumbem durante o início da vida, subjugados pela doença auto-imune. (A) No entanto, se o seu sistema imune é incapacitado pela inativação, nas células germinativas, do gene codificando a enzima Rag-2, a qual é requerida para gerar anticorpos funcionais e genes receptores da célula T, esses camundongos sobrevivem bem se abrigados livres de germes. Sob essas condições, o seu epitélio intestinal é relativamente normal histologicamente. (B) Em contraste, se esses camundongos duplos mutantes forem abrigados em um

lugar no qual a bactéria *Helicobacter hepaticus* está presente, seus cólons tornam-se infectados com essas bactérias e eles desenvolvem adenomas e carcinomas. Isso indica que a inflamação crônica criada pela presença dessas bactérias intestinais é essencial para formação dessas lesões de cólon. (C) A colite ulcerativa humana envolve a inflamação crônica de regiões da mucosa do cólon, a qual leva, após vários anos, a um aumento substancial do risco de carcinoma do cólon. Nessa condição, as áreas estromais entre as criptas do cólon são infiltradas por vários linfócitos (*núcleos pequenos de cor púrpura-escura*). (A e B, de S.J. Engle, I. Ormsby, S. Pawlowski et al., *Cancer Res.* 62: 6362-6366, 2002; C, cortesia de D. Lamarque.)

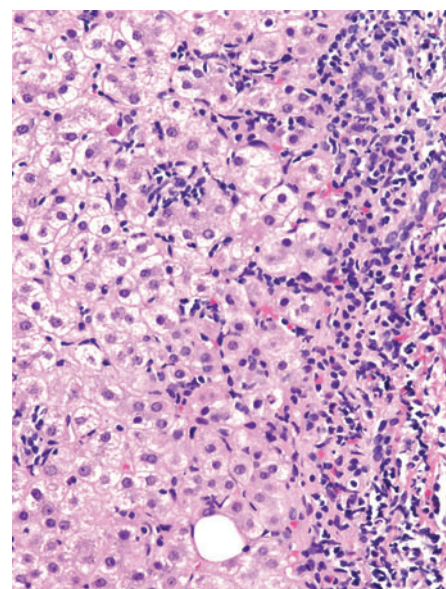


(A)



(B)

HBV



HCV

esquerda). Em muitos indivíduos infectados, a infecção por HBV é bem-estabelecida no fígado, precocemente, durante a vida e continua de forma crônica ativa por décadas. A hepatite resultante pode ter pouco efeito individual externo, uma vez que a morte contínua de hepatócitos (as células que formam a maior parte do fígado) pelo HBV é compensada por igual proliferação das células sobreviventes.

O genoma do HBV carrega um gene chamado *HBX*, que mostra pequeno poder oncogênico e pró-apoptótico, mas esse gene, por si só, dificilmente explica a habilidade do HBV de induzir carcinomas hepáticos após décadas de infecção crônica. Isso leva à busca de outros mecanismos carcinogênicos. Assim, o HBV pode atuar como um carcinógeno do fígado por meio de mecanismos que imitam a estratégia de retrovírus não-portadores de oncogenes. Lembre-se que esses vírus, notavelmente o vírus da leucitose aviária e o vírus da leucemia murina, induzem o câncer vagarosa e ineficientemente. Quando, depois de muitos meses, eles finalmente conseguem, isso ocorre por meio de mutagênese de inserção: a chance da integração de um pró-vírus próximo a um gene de controle de crescimento celular crítico – um proto-oncogene (Seção 3.11). A desregulação resultante da expressão do proto-oncogene efetivamente converte esse gene em um oncogene, abrindo caminho para a formação de um câncer.

No caso do câncer de fígado induzido pelo HBV, no entanto, a situação é um tanto diferente. Análises moleculares extensivas falharam em demonstrar que os genomas de cânceres de fígado humano associados a vírus carregavam genomas do HBV integrados próximos a um gene de controle de crescimento celular crítico, como o proto-oncogene *myc*. Então, é improvável que o HBV atue diretamente como um mutagênico em células do fígado infectadas.

Isso abre duas possíveis explanações para o câncer induzido por vírus. O HBV cria o câncer de fígado por meio de sua habilidade de causar proliferação celular contínua em um órgão que em geral raramente experimenta tal coisa; essa proliferação é requerida para repor hepatócitos que são continuamente mortos durante os ciclos de infecção do HBV. Alternativamente, a infecção pelo HBV faz com que as células do sistema imune tentem eliminar as células infectadas por vírus, gerando um estado crônico de inflamação do fígado (veja a Figura 11.35B). É provável que ambos os mecanismos conspiram na patogênese de carcinomas hepatocelulares que tão frequentemente afligem indivíduos com infecções crônicas por HBV.

Desde que esses estudos foram empreendidos, tornou-se claro que as infecções crônicas da hepatite pelo vírus C (HCV) atuam de maneira similar para aumentar as taxas de câncer de

Figura 11.35 Inflamação crônica levando ao câncer (A) Uma demonstração gráfica de uma inflamação crônica levando ao câncer é dada por carcinomas das células do revestimento da vesícula biliar (*massa branca, acima*), a qual está comumente associada a cálculos da vesícula que vêm de precipitados da bile (*massas marrons, abaixo*). (B) Infecção crônica pelo vírus da hepatite B (HBV) causa morte celular contínua de hepatócitos junto com a inflamação crônica (*núcleos densos pequenos, painel à esquerda*). Por um período de décadas, isso pode levar a um aumento de 100 vezes do risco de câncer hepático. A inflamação do fígado de alguém sofrendo de inflamação crônica pelo vírus da hepatite C (HCV) é impressionantemente similar (*painel à direita*). As células inflamatórias estão na parte direita dessa micrografia. O fato de essas duas condições inflamatórias serem tão similares e levarem a aumentos do risco de carcinoma hepatocelular comparáveis sugere que as condições inflamatórias, mais propriamente do que algum aspecto específico da função viral, sejam responsáveis pelo aparecimento do HCC em pacientes infectados com qualquer uma dessas viroses. (A, de A.T. Skarin, Atlas of Diagnostic Oncology, 3rd ed. Philadelphia: Elsevier Science Ltd., 2003; B, esquerda – cortesia de A. Perez-Atayde, direita – cortesia de A.K. Bhan.)

Barra lateral 11.14 As infecções pelo vírus da hepatite B levam a hepatomas em tailandeses trabalhadores do governo Estudos epidemiológicos normalmente geram resultados que tornam difícil discernir uma forte correlação entre a exposição ocasional a certos fatores ambientais e o aumento moderado subsequente no risco de câncer. A incidência do câncer de fígado, no entanto, varia dramaticamente pelo mundo, o que torna possível associar essa doença com um fator causador. Em certas partes do mundo, incluindo muito da Ásia – especialmente a China – e a África Subsaariana, carcinomas hepatocelulares (HCCs, também conhecidos como hepatomas) são uma das causas que levam a morte devido ao câncer; nos Estados Unidos, o câncer de fígado, em contraste marcante, está em 25º lugar no ranking de mortes relacionadas ao câncer.

Uma impressionante correlação pode ser feita entre as infecções pelo vírus da hepatite B (HBV) e a suscetibilidade ao câncer. Um estudo de prospecção epidemiológico foi feito em 1975 com 22.707 homens que trabalhavam nos serviços do governo de Taiwan. Sua condição ao HBV foi determinada no início do estudo analisando-se, entre

outras coisas, a presença de antígenos virais no sangue. As causas de morte nesse grupo foram posteriormente registradas nas próximas décadas. Por volta de 1986, 152 dos 3.454 homens que eram positivos para o antígeno viral do HBV tinham morrido de carcinomas hepatocelulares. Por comparação, nove dos 19.253 homens que eram negativos para esse antígeno em seu sangue morreram dessa doença. O risco relativo (RR) de morrer por essa doença se alguém carregava o antígeno viral em sua circulação (o qual é indicativo da infecção ativa por HBV no fígado) era 98,4. Isso significa que um indivíduo afetado por uma infecção crônica ativa experimentava um aumento do risco de contrair esse câncer quase 100 vezes maior comparado com alguém que não tinha esse antígeno no seu fígado e estava, aparentemente, não-infectado. Esses números contrastam fortemente com a maioria das correlações epidemiológicas feitas entre a exposição específica de pacientes a carcinógenos suspeitos e a incidência de doença, em que o risco relativo da doença é geralmente apenas de 2 a 3 vezes maior – muitas vezes ficando próximo do limite de significância estatística.

fígado. Se, por um lado, os dois vírus não estão relacionados um com o outro em respeito a estrutura do seu genoma e ciclos de replicação, eles compartilham efeitos biológicos similares por meio de sua habilidade de criar infecções crônicas, citotoxicidade e inflamação do fígado (Figura 11.35B, *painel esquerdo*). (Significativamente, uma grande variedade de outros tipos de danos crônicos ao fígado, incluindo aqueles infligidos pelo alcoolismo, também estão associados ao aumento da incidência do carcinoma hepatocelular, apesar dos riscos relativos serem muitíssimo menores do que aqueles associados à exposição, durante uma vida, à infecção do HBV.)

O HBV, atuando como um promotor de tumor, pode também funcionar sinergeticamente com a aflatoxina-B1, um composto altamente mutagênico produzido pelo fungo *Aspergillus* que se prolifera em amendoins, nozes e milho armazenados sob condições de alta umidade (veja a Figura 2.25). A combinação da infecção com a exposição à aflatoxina provou ser mortal. Em um (relativamente pequeno) estudo de prospecção epidemiológica feito em Xangai, a infecção por HBV aumentou o risco de carcinoma hepatocelular em sete vezes, enquanto a exposição a comida contaminada pela aflatoxina B-1 resultou em um aumento do risco de três vezes. Quando um indivíduo experimentou ambos os agentes, o risco de câncer hepático aumentou cerca de 60 vezes. O paralelo entre a patogênese desses carcinomas de fígado humano e a ação de iniciadores e promotores de cânceres de pele de camundongos é impressionante.

Ainda outras indicações de agentes infecciosos induzindo inflamação e, então, malignidades de humanos vêm de indivíduos afligidos por linfomas surgidos do tecido linfóide associado à mucosa gástrica (MALT). Setenta e cinco por cento dos linfomas MALT podem ser curados se o paciente é tratado com antibióticos que erradiquem a população de *Helicobacter pylori* no estômago. Esses linfomas MALT são claramente dependentes da estimulação continuada dos promotores – nesse caso, a presença de *H. pylori*. Os 25% dos linfomas que não respondem a esse tratamento evoluíram além dessa dependência e tornaram-se “independentes de promotor”, possivelmente porque sustentam uma translocação entre os Cromossomos 11 e 18, com frequência, observada nesses linfomas.

11.16 A promoção de tumores dependente de inflamação opera por meio de vias de sinalização definidas

Evidências que dão suporte ao papel da inflamação no desenvolvimento do câncer também vêm de um grande número de observações epidemiológicas demonstrando que drogas an-

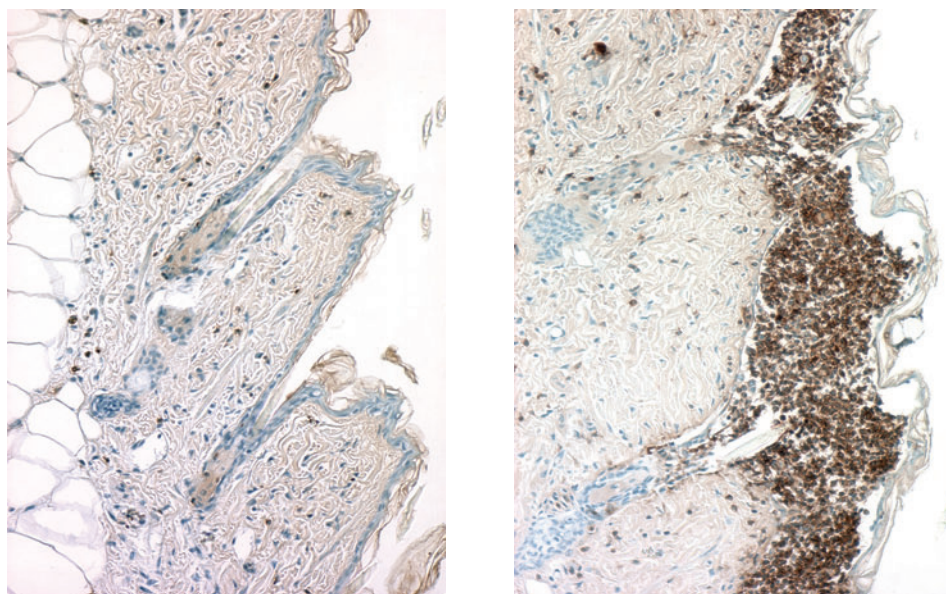


Figura 11.36 TPA e a indução de inflamação na pele de camundongos O poder inflamatório do TPA é revelado de forma exagerada em camundongos transgênicos que superexpressam a PKC- α , o alvo intracelular do TPA, especificamente nos seus queratinócitos. (Isso é conseguido pela construção de um transgene no qual a expressão do PKC- α é dirigida pelo promotor de transcrição queratina 5, o qual é específico para a pele.) Dezoito horas depois que camundongos do tipo selvagem ou transgênicos foram tratados com TPA, a pele dos camundongos do tipo selvagem (*esquerda*) mostra relativamente poucos neutrófilos (*manchas escuras*), os quais são importantes mediadores imunes da inflamação. Em contraste, a pele dos camundongos transgênicos (*direita*) mostra uma infiltração extensiva de neutrófilos. Os neutrófilos foram detectados usando-se anticorpos que reconhecem um antígeno específico do neutrófilo. (De C. Cataisson., E. Joseloff, R. Murillas et al. *J. Immunol* 171: 2703-2713, 2003).

tiinflamatórias, como aspirina e sulindac, funcionam na redução da incidência de uma variedade de carcinomas humanos. Por exemplo, um estudo mostrou que aqueles que tomam doses baixas de uma droga antiinflamatória não-esteroidal (NSAID) – um comprimido de aspirina uma ou duas vezes ao dia durante um período de 15 anos – tiveram um índice de câncer de pulmão de 0,68, índice de câncer de mama (em mulheres) de 0,70 e, em homens jovens, um índice de câncer colorretal de 0,35 comparado com os índices de cânceres em grupos controle. Outro estudo epidemiológico prospectivo com um grande grupo de mulheres durante um período de sete anos encontrou que aquelas que tomavam aspirina regularmente tinham a metade do risco de desenvolver câncer pancreático em relação ao grupo controle. Dois estudos mostraram que o uso regular da aspirina (ou outro NSAID) resultou na redução de cerca de 40% de cânceres de estômago (na região do estômago fora da cárdia) em indivíduos que estavam infectados com *Helicobacter pylori*, a bactéria que frequentemente habita o estômago humano; cânceres de estômago em indivíduos não-infectados não foram reduzidos pelo uso de aspirina. Outros estudos ainda indicam redução nos índices de mortalidade associados a carcinomas de ovário, bexiga e próstata.

(Esses efeitos poderiam sugerir que os NSAIDs, que também podem reduzir certos tipos de doenças cardiovasculares, deveriam ser usados rotineiramente como preventivos da doença na população geral. No entanto, uma precaução vem de outra estatística de saúde pública: em 1998, 16.550 mortes nos Estados Unidos foram atribuídas a complicações gastrointestinais induzidas por NSAIDs.)

As observações epidemiológicas ligando o uso de longa duração de NSAID à redução da incidência do câncer, junto com os experimentos de carcinogênese em pele e fígado de camundongos, nos leva aos mecanismos bioquímicos e biológicos celulares que são responsáveis pela promoção de tumores em vários tecidos. Uma pista importante veio da identificação do alvo celular *downstream* do TPA – a proteína cinase C- α (PKC- α). A dramática demonstração do papel-chave dessa enzima na mediação da inflamação de pele induzida pelo TPA é dada pelos queratinócitos da pele de camundongo que são forçados a superexpressá-la (Figura 11.36).

Em queratinócitos tratados com TPA, PKC- α sinaliza, em parte, pela ativação de IKK (I κ B cinase); o último fosforila I κ B (inibidor de NF- κ B), marcando-o para a destruição. Assim, o NF- κ B é liberado (veja a Figura 6.29A) e migra do citoplasma para o núcleo, onde induz a transcrição de um grande “eleitorado” de genes. Entre eles estão genes que bloqueiam a apoptose e favorecem a proliferação celular. É importante salientar que o NF- κ B também induz a

expressão do gene que codifica para o fator α de necrose tumoral (TNF- α), um potente atraente de células do sistema imune (i. e., uma citocina) que dispara a inflamação localizada na pele de camundongos, assim como em vários tecidos epiteliais. (Como o nome infere, o TNF- α foi originalmente descoberto como um indutor de morte de células cancerosas. No entanto, quando suas ações foram exploradas em grande detalhe, seu papel como maior intermediário na inflamação dos tecidos tornou-se evidente.)

Camundongos que não possuem cópias funcionais do gene TNF- α respondem ao protocolo de carcinogênese de pele (envolvendo o iniciador DMBA e o promotor TPA) desenvolvendo 5 a 10% dos carcinomas em camundongos selvagens. Nos últimos animais, o tratamento com TPA elicitou a produção de TNF- α nos queratinócitos **epidermais**, os quais depois induziram a inflamação nas células do estroma subjacente da **derme**. Juntas, essas várias observações sugerem a seguinte via:

$$\text{TPA} \rightarrow \text{PKC-}\alpha \rightarrow \rightarrow \text{IKK} \rightarrow \rightarrow \text{NF-}\kappa\text{B} \rightarrow \text{TNF-}\alpha \rightarrow \text{inflamação}$$

Em outro modelo de tumor de camundongo ilustrativo, a carcinogênese do fígado foi provocada por meio da deleção do gene *Mdr* (resistência a múltiplas drogas) na linhagem germinativa do camundongo (veja a Barra lateral 7.10); a perda desse gene e do seu produto leva ao acúmulo de ácidos biliares, resultando na inflamação crônica do fígado. Camundongos afetados desenvolvem nódulos de hepatócitos displásicos, localizados em carcinomas hepatocelulares (HCCs) e, finalmente, em HCCs metastáticos.

Nos fígados desses camundongos, o TNF- α é inicialmente produzido por células endoteliais inflamadas, assim como células imunes inflamatórias infiltrantes no estroma, como os neutrófilos e macrófagos. O TNF- α liberado atua de maneira parácrina nos hepatócitos próximos, que apresentam receptores para TNF- α . Como o PKC- α nos queratinócitos, o receptor de TNF- α , ativado pelo ligante, desses hepatócitos converge os sinais através da via NF- κ B (Seção 6.12). Como descrito anteriormente, NF- κ B é despachado para o núcleo, onde ativa genes antiapoptóticos, genes que favorecem a proliferação e o gene TNF- α . O TNF- α resultante, uma vez liberado pelos hepatócitos, atrai mais células inflamatórias por meio da sinalização *parácrina* e amplifica a sinalização de NF- κ B pelos hepatócitos por meio de sinalização *autócrina*.

Quando a sinalização NF- κ B foi bloqueada em hepatócitos de camundongos *Mdr*^{-/-}, a incidência de tumores foi fortemente suprimida (Figura 11.37). Essa inibição da sinalização pode ser conseguida pela introdução de um anticorpo anti-TNF- α nos camundongos *Mdr*^{-/-} (os quais bloquearam a sinalização parácrina entre as células inflamatórias do estroma e os hepatócitos) ou pela expressão não-degradável de I κ B nos hepatócitos (a qual inibiu a ativação da NF- κ B). Em ambos os casos, a perda da sinalização da NF- κ B resultou em índices grandemente aumentados de apoptose em hepatócitos pré-neoplásicos. De fato, a prevenção da apoptose explicaria provavelmente muito do efeito promotor da inflamação no modelo em camundongo. Interessantemente, a suspensão da sinalização de NF- κ B nos hepatócitos não preveniu os passos iniciais da progressão de tumor do fígado – hepatite, inicialização tumoral e desenvolvimento da displasia –, mas a subsequente progressão do tecido displásico de carcinomas hepatocelulares foi bloqueada. Por isso, nesse modelo experimental, o TNF- α e o NF- κ B estão envolvidos na promoção, e não nos estágios iniciais de inicialização (veja a Figura 11.37).

Uma conclusão similar foi conseguida em estudos de modelos de cânceres de cólon associados a colite em camundongos: a inativação da sinalização por IKK levou a grandes aumentos nas taxas apoptóticas em enterócitos pré-cancerosos – as células epiteliais que revestem o cólon. Sem a sinalização de NF- κ B, essas células falharam em expressar elevados níveis do potente antiapoptótico Bcl-X_L (Figura 9.25) e, em vez disso, produziram altos níveis de proteínas pró-apoptóticas Bax e Bak. Mais uma vez, alguns dos efeitos promotores de tumor da NF- κ B puderam ser traçados pela sua habilidade de proteger células epiteliais inicializadas da apoptose.

Essas descrições indicam que a sinalização por NF- κ B é altamente ativa nas células epiteliais de tecidos inflamados (p. ex., hepatócitos no fígado, enterócitos no cólon). A

inflamação é criada por células inflamatórias do sistema imune (notavelmente, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, mastócitos e linfócitos) que são recrutadas para os compartimentos estromais desses tecidos, onde liberam sinais pró-inflamatórios. De forma importante, a via do NF- κ B também opera nessas células imunes do estroma, permitindo-lhes liberar sinais pró-inflamatórios como o TNF- α . Por exemplo, no modelo citado anteriormente de colite e câncer colorretal, a suspensão da sinalização do IKK nas células imunes inflamatórias do estroma intestinal também levou a uma significativa supressão da formação do tumor colorretal.

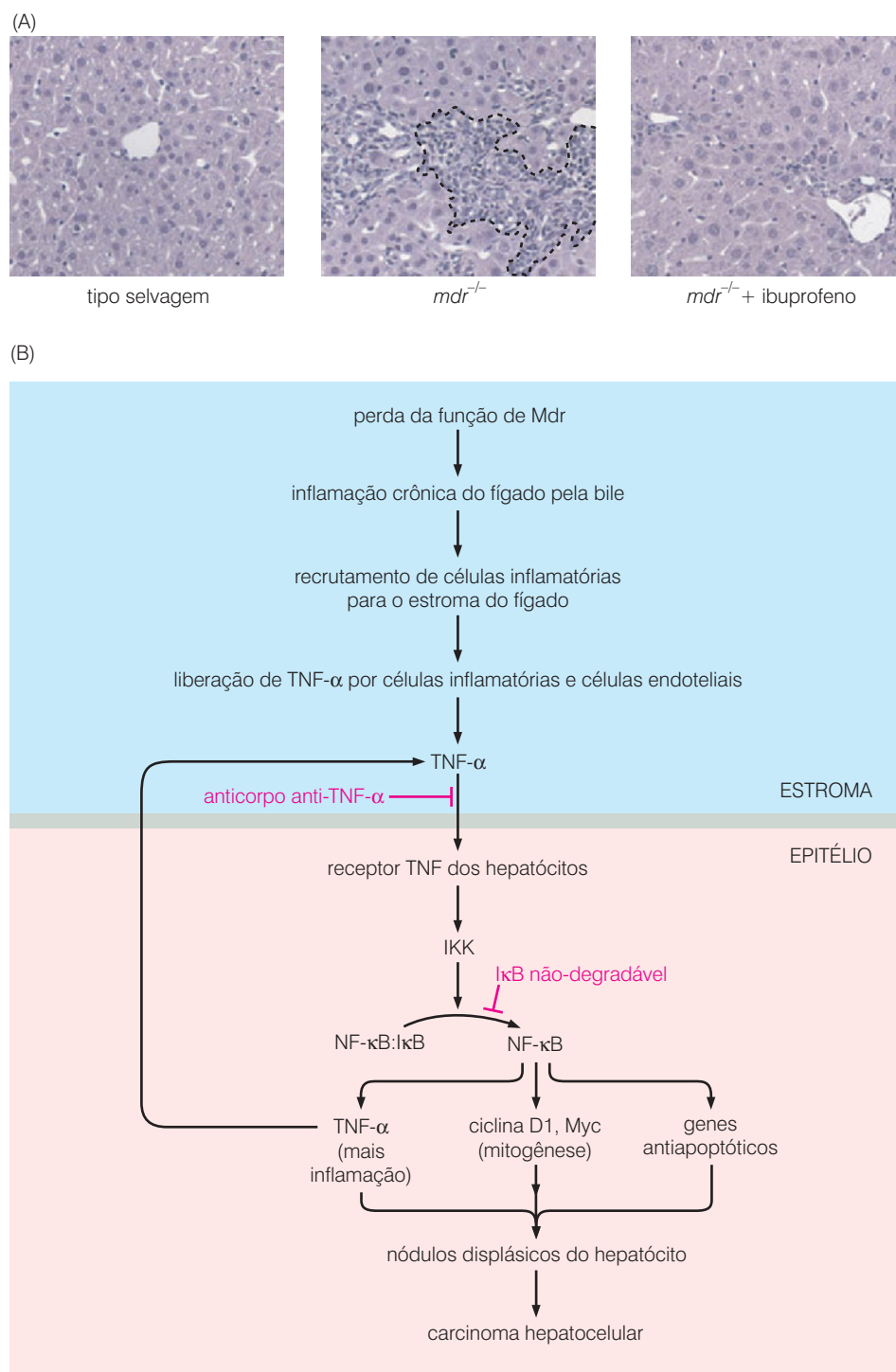
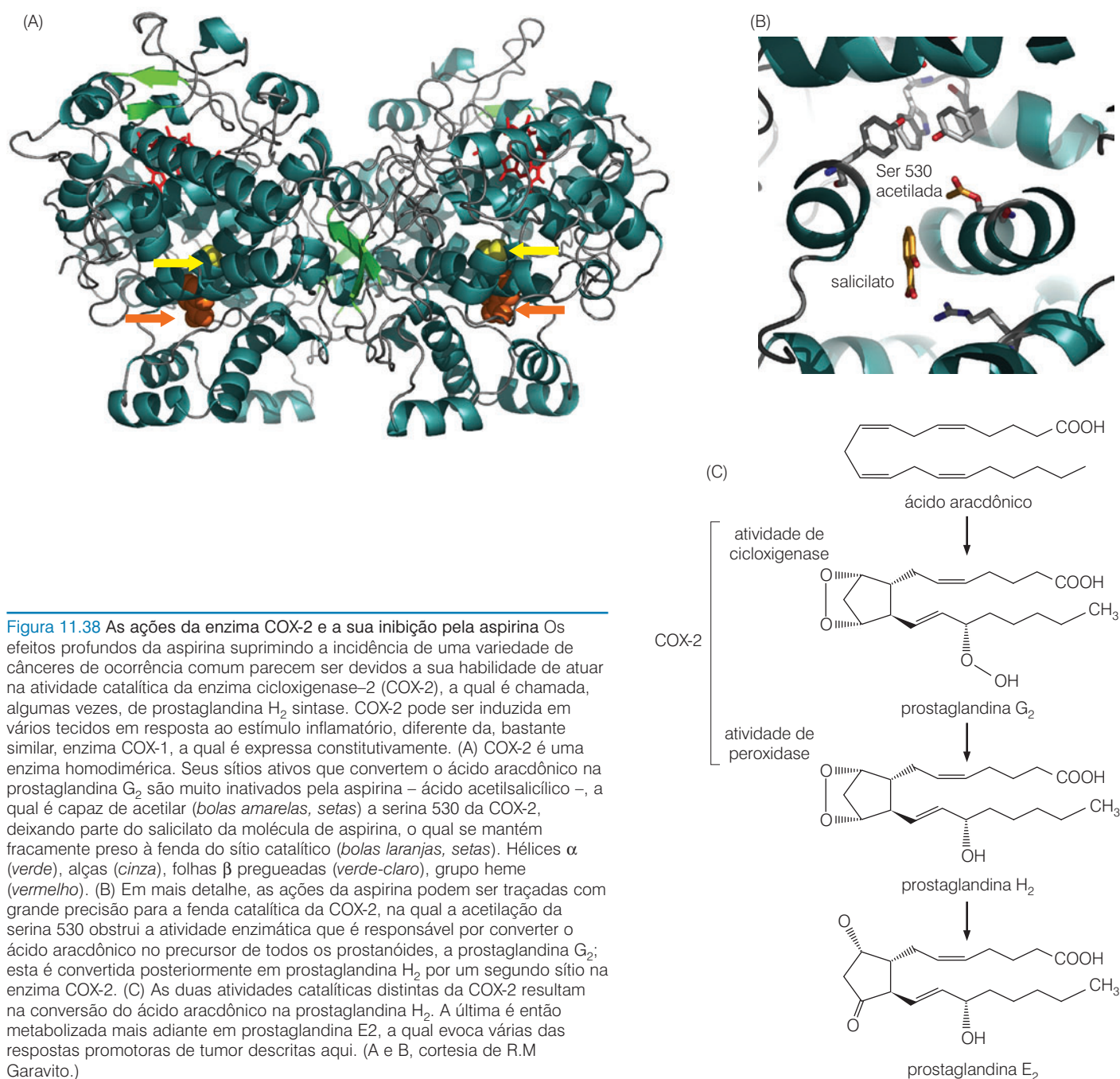
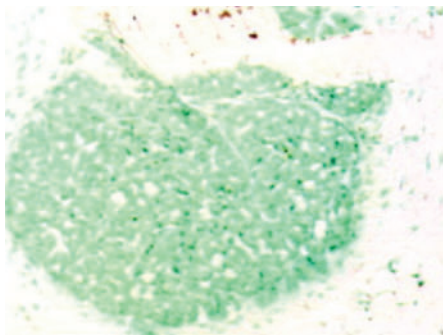


Figura 11.37 A inflamação crônica do fígado atua via NF- κ B para induzir carcinomas hepatocelulares. Nesse modelo de carcinogênese em camundongo, a deleção do gene *mdr* (resistência a múltiplas drogas) causa a inflamação crônica do fígado, a qual gera focos displásicos entre os hepatócitos, alguns dos quais progridem para formar carcinomas hepatocelulares. (A) Um infiltrado de células inflamatórias no fígado de um camundongo *mdr*^{-/-} (esboçado, *painel central*) contrasta com um fígado normal (*painel esquerdo*) ou com o fígado de um camundongo *mdr*^{-/-} que foi tratado com ibuprofeno, um potente antiinflamatório (*painel direito*). Essas áreas de infiltrado inflamatório parecem ser críticas para a formação dos focos displásicos, alguns dos quais finalmente progridem para carcinomas hepatocelulares. (B) Esses vários passos podem ser resumidos nesse diagrama de fluxo. Um estado de inflamação crônica provocado pela bile do fígado atrai células inflamatórias para o estroma do fígado que liberam TNF- α , o qual encontra os hepatócitos localizados no compartimento epitelial do fígado. Uma vez ativado, o receptor TNF dos hepatócitos atua via IKK para ativar a sinalização NF- κ B nessas células, o que resulta na ativação de genes antiapoptóticos, como o Bcl- X_L , genes proliferativos, como aquele que codifica para a ciclina D1, e o gene que especifica o TNF- α . Juntas, essas proteínas funcionam nos nódulos displásicos dos hepatócitos para facilitar a progressão de carcinomas hepatocelulares. Essa progressão pode ser bloqueada por anticorpos reativos para a TNF- α , assim como um dominante-negativo e não degradável do I κ B. (As ações das drogas antiinflamatórias não estão explicadas nesse diagrama.) (A, de E. Pikarsky, R.M.Porat, I. Stein et al. *Nature* 431:461-466, 2004.)

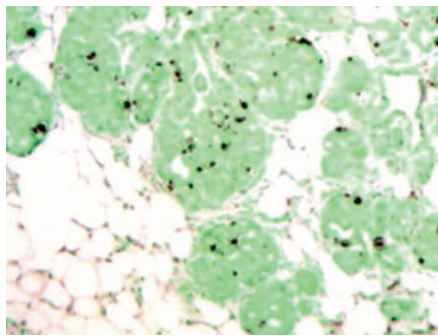
Nada disso explica como os NSAIDs, como aspirina, ibuprofeno e sulindac, bloqueiam a promoção do tumor e assim a progressão tumoral. Essas drogas, e muitas das outras NSAIDs, têm como alvo comum a enzima ciclooxigenase-2 (COX-2; Figura 11.38). De fato, o gene *Cox-2* é ainda outro gene que é fortemente induzido pela NF- κ B. O papel crítico dessa enzima na mediação das respostas inflamatórias que conduz para malignidades epiteliais é ilustrado por um experimento com camundongos geneticamente alterados que foram predispostos, devido a uma mutação do gene *Apc* na linhagem germinativa, a desenvolver centenas de pólipos intestinais (veja a Seção 7.11): o número de pólipos foi reduzido por um fator de 7 quando o gene *Cox-2* foi inativado na linhagem germinativa desses camundongos. (Como COX-2, assim como o NF- κ B, opera em ambas, células inflamatórias do estroma e células epiteliais próximas, a perda dessa enzima provavelmente afetou ambos os tipos celulares.) De forma similar, quando a atividade da enzima COX-2 foi suspensa farmacologicamente (pelo



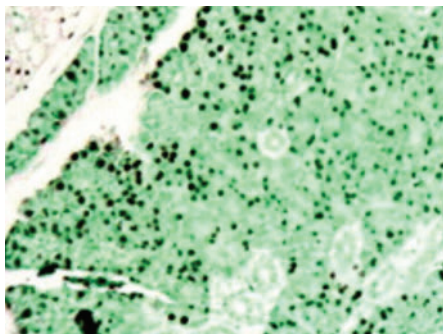
(A) ensaio TUNEL (apoptose)



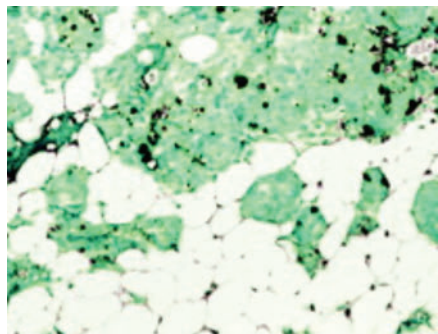
controle com solvente



5 mg/kg celecoxib

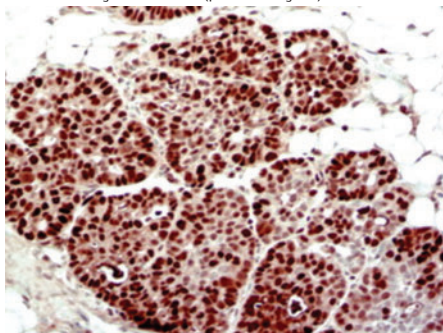


10 mg/kg celecoxib

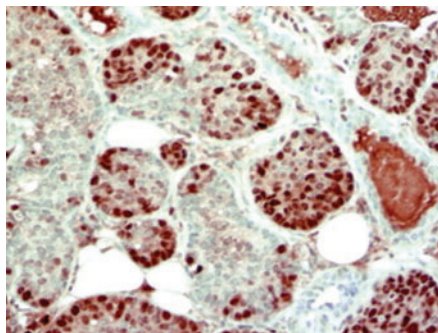


20 mg/kg celecoxib

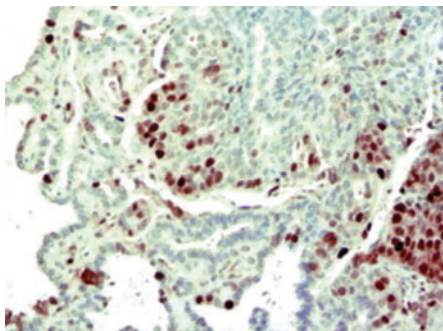
(B) coloração PCNA (proliferação)



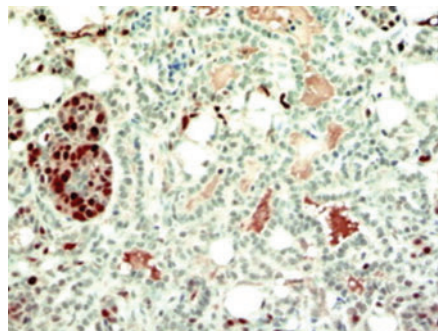
controle com solvente



5 mg/kg celecoxib



10 mg/kg celecoxib



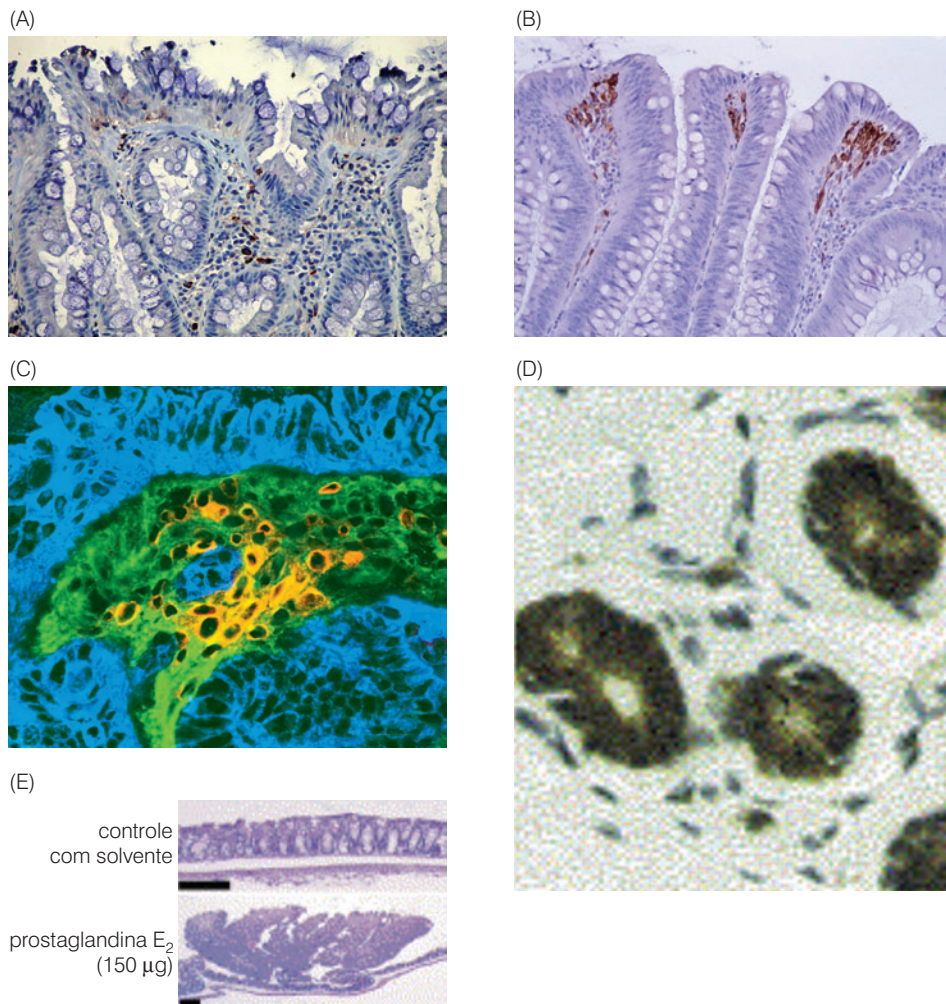
20 mg/kg celecoxib

Figura 11.39 Inibição da COX-2 em carcinomas mamários em camundongos transgênicos predispostos a tumor. No modelo da patogênese do carcinoma mamário de camundongo transgênico, o desenvolvimento de tumores, dirigido pela oncoproteína "middle T" de poliomavírus, é fortemente reduzido pelo tratamento com celecoxib, um NSAID que é um inibidor potente e seletivo da cicloxigenase-2 (COX-2). (A) Como indicado aqui, doses aumentadas dessa droga geram um número progressivamente maior de células tumorais (verde-claro) que são coradas pelo ensaio de TUNEL (manchas marrom-escuras), um marcador da apoptose. (B) De modo oposto, concentrações aumentadas de celecoxib levam à diminuição da proliferação celular, como revelado pela coloração para PCNA (antígeno nuclear de célula proliferativa) (vermelho-escuro), um marcador da progressão do ciclo celular. Em todos os casos, as doses indicadas de celecoxib são apresentadas como miligramas de droga por quilograma de peso corporal. (De G.D. Basu, L.B. Pathangey, T.L. Tinder et al., *Mol. Cancer Res.* 2: 632-642, 2004.)

uso de um NSAID), o desenvolvimento de carcinomas mamários em camundongos transgênicos predispostos a tumores foi bastante suprimido (Figura 11.39).

O efeito oposto foi observado quando a expressão elevada de COX-2 foi forçada no tecido mamário de camundongos transgênicos: esses camundongos apresentaram taxas significati-

Figura 11.40 Expressão da COX-2 e os efeitos do seu produto PGE_2 *downstream*. A enzima cicloxigenase-2 (COX-2) é um importante mediador da inflamação pela sua habilidade de converter o ácido aracôdnico em prostaglandinas, as quais geram, entre outros produtos, a prostaglandina E_2 (PGE_2). Uma vez produzida, a PGE_2 pode atuar de maneira parácrina para induzir alterações pré-neoplásicas em células vizinhas ou de maneira autócrina na célula que a produziu. A função da COX-2 é, provavelmente, importante nos estágios iniciais da progressão do carcinoma em uma variedade de tecidos. No entanto, sua expressão celular tipo-específica difere de um tecido para outro. (A) Em um pólipó colorretal hiperplásico de humano, a enzima COX-2 pode ser vista por imunomarcacão (*manchas marrons*) por ser expressa por células endoteliais e macrófagos. (B) Observa-se que, em um pólipó adenomatoso mais avançado, a expressão está aumentada em miofibroblastos, outro tipo celular do estroma (*manchas marrons*). (C) Nesse pólipó adenomatoso intestinal de camundongo geneticamente predisposto para a polipose devido a uma mutação da linhagem germinativa no gene *Apc* (Seção 7.11), as células epiteliais estão imunocoradas de azul por um anticorpo anticitoqueratina, e as células do estroma (85% de fibroblastos e 5% de células endoteliais) estão coradas de verde com anticorpo anti-vimentina. As áreas expressando vimentina e COX-2 estão coradas de amarelo. (D) Na mama humana, no entanto, a expressão de COX-2 (imunomarcacão marrom-escura) é encontrada alta em tumores pré-malignos nas células epiteliais mais propriamente do que nas células do estroma circundantes. (E) Alimentando-se camundongos da linhagem mutante *Apc* com PGE_2 (um produto *downstream* da função da COX-2), causa-se um dramático aumento do número de pólipos do cólon (*abaixo*) comparado com aqueles vistos nos camundongos mutantes *Apc* (*acima*). (A e B, de P.A. Adegbayegbe, O. Oloade, J. Saada et al., *Clin. Cancer Res.* 10: 5870-5879, 2004; C, cortesia de M. Sonoshita e M.M. Taketo; D, de Y.G. Crawford, M.L. Gauthier, A. Joubel et al., *Cancer Cell* 5: 263-273, 2004; E, de D. Wang, H. Wang, Q. Shi et al., *Cancer Cell* 6:285-295, 2004.)



vamente elevadas de cânceres de mama. Um experimento análogo, no qual essa enzima foi dirigida por um transgene de camundongo que causou a sua expressão elevada em queratinócitos, levou a hiperplasia e displasia da pele.

COX-2 é expressa no compartimento do estroma cedo na tumorogênese em alguns tecidos e no compartimento epitelial de outros (Figura 11.40). Em certos tecidos epiteliais, a expressão de COX-2 aumenta no compartimento epitelial conforme a progressão do tumor avança, até que sua expressão seja elevada a 10 ou mais vezes acima dos níveis normais.

A enzima COX-2 expressa por células do estroma e do epitélio produzem uma série de prostaglandinas a partir do ácido aracôdnico. A prostaglandina E_2 (PGE_2) parece ser a mais importante delas (veja a Figura 11.38C). A aplicação dessa prostaglandina em células normais do epitélio intestinal em cultura faz com que elas apresentem diversos traços associados à transformação celular – perda da inibição por contato, crescimento independente de ancoragem aumentado, expressão diminuída da proteína da superfície celular E-caderina, apoptose reduzida e taxa de proliferação aumentada. Ainda mais importante, quando os camundongos que são propensos a desenvolverem pólipos gastrintestinais são alimentados com PGE_2 , o número desses tumores no cólon aumenta dramaticamente (Figura 11.40E).

Uma vez que o PGE_2 pode se difundir de célula a célula, é provável que cedo durante a progressão tumoral a expressão de COX-2 em células inflamatórias do estroma resulte na liberação dessa prostaglandina, a qual atua de maneira *parácrina* para induzir os vários traços associados a transformações em células epiteliais próximas (p. ex., os enterócitos do cólon). No entanto, conforme

avança a progressão do tumor, os níveis de COX-2, em aumento nos enterócitos, permitem que eles façam sua própria PGE_2 , a qual estimula sua proliferação de uma forma *autócrina* e, uma vez mais, permite a eles assumir vários traços associados com a transformação celular.

Estágios iniciais de pólipos de cólon parecem depender da inflamação induzida continuamente por prostaglandinas como a PGE_2 para sua manutenção. No entanto, mais tarde, conforme esses crescimentos evoluem em direção a um grau mais alto de neoplasia, eles não dependem mais das prostaglandinas para sua manutenção e expansão. Isso imita o modelo experimental de carcinogênese de pele de camundongos, no qual papilomas de estágio inicial dependem de promotores de tumor, como o TPA, para sua manutenção, enquanto papilomas avançados tornam-se independentes de promotor.

Consideradas juntas, tais observações conduzem a um modelo interessante (Figura 11.41) de como a inflamação em uma variedade de tecidos epiteliais, funciona como um mecanismo promotor de tumor e, finalmente, leva aos carcinomas. Esse esquema provavelmente mudará, visto que vários dos passos indicados continuam sendo objeto de investigação intensa. Talvez a maior incerteza repouse no(s) mecanismo(s) usado(s) pelos NSAIDs para inibir a progressão do tumor: enquanto a COX-2 é um alvo claro da sua ação, é possível que outras enzimas celulares sejam afetadas também por essas drogas, e a inibição desses outros alvos das NSAIDs também contribua para desacelerar e bloquear a tumorigênese de múltiplas etapas.

Os detalhes do esquema descrito na Figura 11.41 também nos fornecem outro ponto de vista sobre a progressão tumoral. Muitos dos fenótipos conferidos pelas prostaglandinas associadas

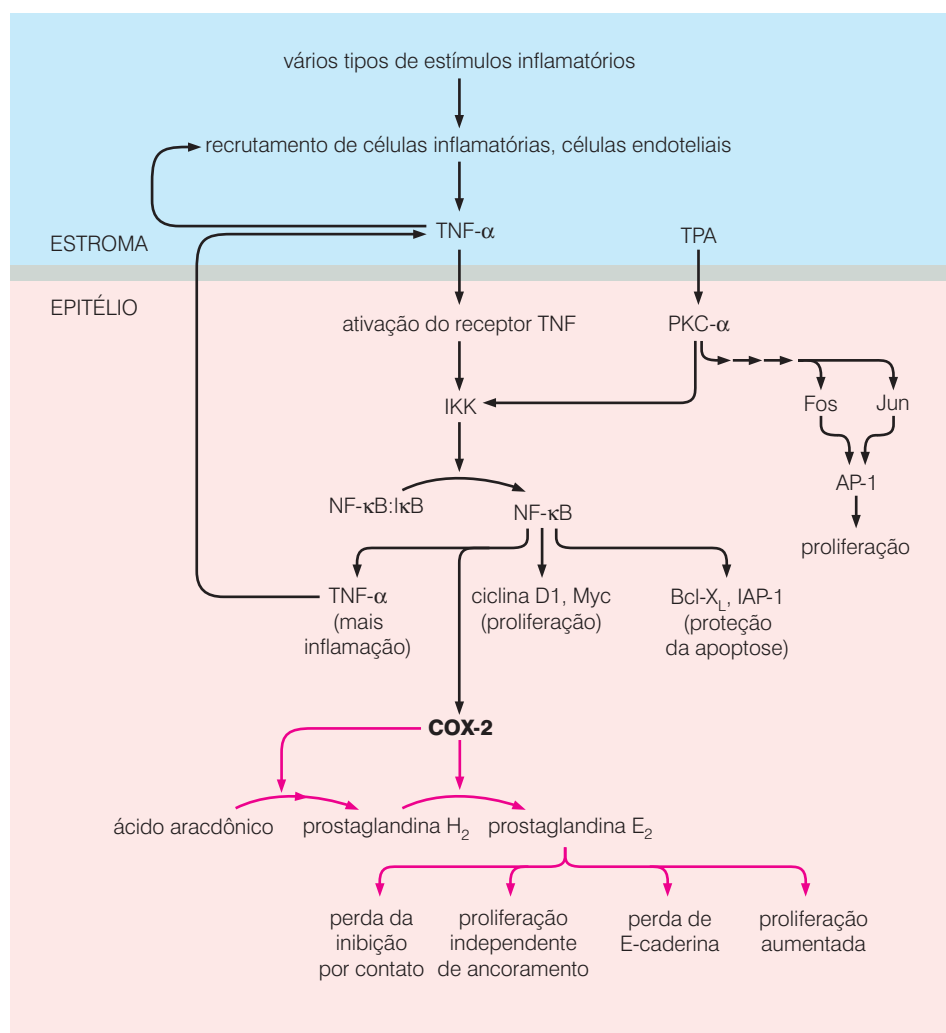


Figura 11.41 Um modelo de inflamação epitelial e promoção tumoral A informação vinda da promoção tumoral de pele e fígado, como ilustrado nas Figuras 11.31 e 11.37, pode ser integrada em um modelo mais geral. O estímulo inflamatório, incluindo as infecções crônicas, resulta no recrutamento de células inflamatórias para as áreas de inflamação. Essas células, assim como as células epiteliais nas adjacências, liberam TNF- α , o qual ativa a via do NF- κ B nas células epiteliais, causando a produção de mais TNF- α , proteínas antiapoptóticas (p. ex., Bcl-X_L, IAP-1 e 2) e proteínas mitogênicas (Myc, ciclina D1), assim como COX-2. Prostaglandinas sintetizadas pela COX-2 (setas rosas) induzem fenótipos múltiplos de células cancerosas, incluindo a perda da inibição por contato, a aquisição de taxas aumentadas de proliferação e o crescimento independente de ancoragem aumentado. O promotor de tumor de pele TPA converge a essa via por meio da ativação da PKC- α ; em adição, a PKC- α ativada pelo TPA pode induzir sinais mitogênicos pela ativação dos fatores de transcrição Fos, Jun e, assim, AP-1 (Seção 6.5). Juntas, essas ações das células inflamatórias e do TPA criam estados fenotípicos que se parecem bastante com aqueles induzidos por vários oncogenes, permitindo que uma célula inicializada lance uma expansão clonal que finalmente resulta na aquisição adicional de alelos mutantes por seus descendentes.

à inflamação são estranhamente similares àqueles conferidos por oncogenes que lemos há pouco. Incluídas aqui, estão as características como a perda da inibição por contato, assim como o crescimento independente de ancoragem e a habilidade de proliferar mais rapidamente. Com efeito, a promoção do tumor pode criar uma **fenocópia** das ações de um oncogene, ou seja, é um estado biológico que lembra muito aquele criado por um oncogene, mas que surge por meio de mecanismos muito diferentes.

Isso sugere que um mecanismo promotor de tumor pode colaborar com um oncogene de uma maneira que lembra a colaboração entre dois oncogenes (Seção 11.10). Assim, células tumorais inicializadas podem contar com essa forma de colaboração até que seus descendentes adquiram oncogenes adicionais e, portanto, não precisem mais depender dos efeitos reversíveis de promotores de tumor para sua contínua proliferação e sobrevivência.

11.17 A promoção tumoral é provavelmente um determinante crítico da taxa de progressão tumoral em vários tecidos humanos

Muitos agentes foram, até agora, classificados como promotores de tumores humanos (Tabela 11.3). Eles têm em comum a habilidade de promover a expansão de clones inicializados. O papel-chave dessa promoção na tumorogênese de múltiplas etapas pode ser mais bem-entendido no contexto dos modelos de sucessão clonal descritos nas Figuras 11.12, 11.17 e 11.18. Para que uma célula inicializada adquira uma mutação adicional, seus descendentes clonais devem se tornar tão numerosos que um segundo evento mutacional de baixa probabilidade seja, provavelmente, capaz

Tabela 11.3 Promotores de tumor humano conhecidos ou suspeitos e seus locais de ação

Agente ou processo	Local do câncer
Hormônios	
Estrogênio	endométrio
Estrogênio e progesterona	mama
Ovulação	ovário
Testosterona	próstata
Drogas	
Contraceptivos orais, esteróides anabolizantes	fígado
Analgésicos	pélvis renal
Diuréticos	rim
Agentes infecciosos	
Víroses da hepatite B/C	fígado
<i>Schistosoma haematobium</i> – trematódeo do sangue	bexiga
<i>Schistosoma japonicum</i> – trematódeo do sangue	cólon
<i>Clonorchis sinensis</i> – fasciola hepática	trato biliar
<i>Helicobacter pylori</i> – bactéria	estômago
Parasitas da malária	célula B
Bacilo da tuberculose	pulmão
Agentes químicos	
Noz-de-areca, visgo	cavidade oral
Mascar tabaco	cavidade oral
Bile	intestino delgado
Sal	estômago
Refluxo ácido	esôfago
Trauma mecânico ou físico	
Amianto	mesotélio, pulmão
Cálculos biliares	vesícula biliar
Milho moído grosseiramente	estômago
Ferimento da cabeça	meninges
Irritação/inflamação crônica	
Úlceras tropicais	pele
Colite ulcerativa crônica	cólon
Cistite crônica	bexiga
Pancreatite crônica	pâncreas

Adaptada, em parte, de S. Preston-Martin, M.C. Pike, R.K. Ross et al., *Cancer Res.* 50:7415-7421, 1990.

de atingir uma ou outra célula da população clonal agora expandida. Sem essa expansão clonal, a nova mutação secundária provavelmente não atingirá ao menos uma das células descendentes (por ser um evento raro por geração celular), e a progressão tumoral irá parar.

Verdadeiramente, esses vários mecanismos de promoção tumoral podem contribuir para a progressão do tumor de, pelos menos, três maneiras. Primeira, como já mencionado, os promotores podem estimular a expansão clonal que gera grandes populações celulares nos quais diferentes eventos de baixa probabilidade tornam-se possíveis.

Segundo, uma vez que a proliferação celular requer a replicação do DNA e que a replicação do DNA gera cópias incorretas – e, assim, seqüências de DNA mutantes – em uma baixa (mas significativa) freqüência, agentes favorecendo a proliferação celular são indiretamente mutagênicos. As repetitivas divisões celulares reservam ainda outros perigos para os genomas de células, uma vez que eventos de recombinação mitótica e a segregação errônea dos cromossomos geram eventos de perda de heterozigossidade (LOH), permitindo que genes supressores de tumor mutantes contribuam para a progressão do tumor.

Terceiro, como discutido no capítulo anterior, ciclos repetitivos de crescimento e divisão levam a diminuição progressiva do DNA telomérico de células-tronco. No final das contas, segue-se o colapso do telômero, e os ciclos quebra-fusão-ponte (BFB) resultam em um desarranjo do cariótipo e, por isso, em mutagênese. E, como descrito na Seção 10.10, os ciclos de BFB ocorrendo na ausência do p53 funcional levam, provavelmente, diretamente a aumentos na incidência do câncer.

De fato, um tipo de promoção tumoral – aquela envolvendo a inflamação – provavelmente tem um efeito adicional na progressão tumoral: as células inflamatórias que são recrutadas para um tecido em geral liberam espécies reativas de oxigênio (ROS); essas podem atacar e mutar o DNA de células epiteliais próximas, nisso somando-se aos efeitos mutagênicos gerados pelos processos endógenos dessas próprias células.

Quando consideradas juntas, essas diversas observações indicam que a equação carcinógeno = mutagênese, a qual previamente destilamos do trabalho de Bruce Ames (Capítulo 2), é simplista. Agora, é obvio que muitos carcinógenos têm sucesso em seu trabalho por meios que não dependem da sua habilidade em danificar diretamente o DNA. Como mencionado, tais agentes não-mutagênicos não podem ser detectados pelo teste de Ames. Isso significa que um resultado positivo no teste de Ames, o qual demonstra a genotoxicidade de um agente químico, provavelmente (mas não de forma garantida) prediz o seu poder de carcinogênese em roedores e humanos. No entanto, um resultado negativo nesse teste não exclui a possibilidade do composto sendo testado poder contribuir na formação de cânceres humanos agindo como um promotor tumoral não-genotóxico.

Alguns agentes carcinogênicos, como o benzo[*a*]pireno (BP) descrito antes, quando aplicados a animais de laboratório como únicos agentes, são capazes, por si próprios, de induzir a formação de tumor após aplicações repetidas. Nisso, eles funcionam como iniciadores e promotores da tumorigênese e, por conseqüência, têm sido chamados de **carcinógenos completos**. Podemos imaginar, por exemplo, que certos agentes mutagênicos sejam também citotóxicos em altas concentrações e, portanto, ajam como promotores tumorais, matando células e induzindo a proliferação compensatória das células sobreviventes em um tecido-alvo. Mas é provável que tais agentes desempenhem um papel menor na carcinogênese humana. A maioria dos carcinógenos genotóxicos entra nos tecidos humanos em concentrações que são muitíssimo pequenas para produzir efeitos citotóxicos. Por isso, para sua formação, os tumores incitados por esses agentes parecem depender muito de outras substâncias que funcionam como promotores de tumor genuínos.

11.18 Sinopse e perspectivas

Começamos este capítulo com a idéia de que as mudanças genéticas são responsáveis por abastecer vários dos passos para progressão do câncer, e que cada uma dessas mutações pode, a princípio, ser traçada a partir de agentes mutagênicos específicos. Conforme nossas discussões sobre a tumoro-

gênese de múltiplas etapas prosseguiram, no entanto, tornou-se cada vez mais claro que outros agentes além dos mutagênicos contribuíam para a patogênese do câncer. Mais especificamente, os promotores parecem ter um papel de igual peso dirigindo a seqüência do desenvolvimento dos tumores, incluindo muitos, senão todos, os cânceres humanos. Essa compreensão ao mesmo tempo torna claras e confunde nossas tentativas de desentocar as raízes dessas malignidades.

É possível, por exemplo, que a maioria dos carcinógenos humanos atue como promotores tumorais (em vez de iniciadores), e que muitos tipos de tumores humanos surjam totalmente sem nenhuma colaboração de agentes genotóxicos exógenos, isso é, mutagênicos originários de fora do corpo humano. Em tais tumores, o dano genético poderia, por necessidade, ser gerado totalmente por processos endógenos.

Essa especulação vem de duas fontes. Primeira, as origens da maioria dos cânceres humanos não têm sido associadas à exposição a agentes mutagênicos específicos. As maiores exceções aqui são os produtos da combustão do tabaco e os produtos do cozimento da carne em altas temperaturas, como veremos no Capítulo 12.

Segundo, o genoma em uma única célula humana mantém cerca de 10 mil modificações a cada dia, de acordo com algumas estimativas. Essas modificações são criadas por espécies químicas que têm sido geradas endogenamente por várias reações metabólicas. Notadamente, entre esses mutagênicos autógenos estão várias espécies reativas de oxigênio (ROS) que surgem como subprodutos do metabolismo oxidativo nas mitocôndrias.

Claramente, a grande maioria dessas lesões químicas é removida por sistema muito eficiente de reparo do DNA operando na maioria das células (Capítulo 12). Algumas dessas lesões, no entanto, escapam da detecção e subsequente reparo, são fixadas nos genomas das células nas quais elas foram inicialmente formadas e são, depois, transmitidas como mutações para as células descendentes. Na maioria dos tecidos humanos, o número de mutações geradas de maneira endógena provavelmente faz com que o número de mutações ocasionadas por origem exógena pareça menor.

Essa informação nos permite cogitar o seguinte cenário: alelos mutantes gerados endogenamente, atuando juntamente com promotores tumorais de origem exógena, dirigem a progressão que leva ao aparecimento de muitos tipos de cânceres humanos. Esses promotores exógenos incluem gêneros alimentícios, infecções e até a fumaça do tabaco, a qual contém muitas substâncias químicas promotoras de tumor. Nesse caso, as buscas pelos carcinógenos mutagênicos exógenos que são suspeitos de serem os agentes etiológicos (causadores) da maioria dos tumores humanos falharão.

A existência de tais substâncias promotoras de tumor, qualquer que seja sua natureza, complica muito as tentativas de desenvolver testes de laboratório para os carcinógenos humanos. De um lado, os freqüentemente utilizados testes *in vitro* para a mutagenicidade (Seção 2.9), como o teste de Ames, levam a um desvio porque não registram a presença de promotores de tumor. De outro lado, se usados sem cautela, certos candidatos a carcinógenos humanos sendo selecionados no laboratório podem ser registrados como promotores tumorais mesmo se esse não for o seu papel normal (Barra lateral 11.15).

Esses argumentos indicam que debates enigmáticos sobre a inicialização *versus* promoção do câncer têm enormes implicações na saúde pública, e más interpretações de processos biológicos, como a promoção tumoral, levam, por conseguinte, a maiores mudanças nas substâncias que consumimos e aquelas que deveríamos evitar (veja, por exemplo, a Barra lateral 11.16).

O reconhecimento da inflamação crônica (Tabela 11.4) e de infecções como duas importantes fontes de promoção tumoral também tem profundas implicações na redução da incidência do câncer. A inflamação pode ser suprimida usando-se drogas antiinflamatórias, como as NSAIDs, e há grande esperança de que algumas delas sejam desenvolvidas nos próximos anos e que elas possam ser tomadas cronicamente sem efeitos colaterais inaceitáveis.

Em uma escala global, é estimado que 9% de todas as mortes pelo câncer surjam devido a inflamações crônicas do estômago pela bactéria *Helicobacter pylori*, levando a carcinomas

gástricos, e que 6% das mortes pelo câncer estejam associadas a cânceres de fígado, a maioria deles causada por infecções crônicas pelos vírus da hepatite B e C. A infecção crônica do epitélio cervical causada pelo papilomavírus humano, notadamente as linhagens 16, 18 e 45, levam, em algumas mulheres, a carcinomas cervicais que computam 5% da mortalidade mundial pelo câncer. (No último caso, os efeitos inflamatórios crônicos de uma infecção viral são compostos por dois oncogenes derivados do HPV, *E6* e *E7*.) Apesar de assustadores, esses fatos representam uma oportunidade enorme para a redução global da incidência e mortalidade do câncer: doenças infecciosas são de controle e prevenção (por meio de imunização) muito mais fácil do que os efeitos dos gêneros alimentícios que são ingeridos e dos produtos do tabaco que inalamos. Por algumas estimativas, 450 milhões de pessoas no mundo estão infectadas cronicamente pelo HBV, enquanto 200 milhões são portadores de longo prazo do

Barra lateral 11.15 Os testes de carcinoma de roedores são indicadores confiáveis do perigo para humanos? Bruce Ames, cujo teste *Salmonella* teve um profundo efeito em nossos testes de carcinógenos humanos potenciais (Seção 2.9), questionou o significado de vários testes de laboratório correntemente usados para acessar o potencial carcinogênico de vários compostos químicos. Esses testes envolvem a exposição de ratos e camundongos a altas doses de um composto-teste por um extenso período, seguido de exames histopatológicos para detectar tumores que possam ter surgido nos animais expostos.

Muitos desses testes com roedores são conduzidos em doses que estão próximas ou na dose tolerada máxima (MTDs) desses compostos; acima dessas doses, os compostos testados começam a induzir danos óbvios em vários órgãos de sistema dos animais expostos e, portanto, geram efeitos óbvios na saúde do animal. (Esses testes com MTD em geral envolvem exposição a concentrações que são muitas vezes maiores do que aquelas experimentadas pela população

humana. Por exemplo, a exposição humana a aminas heterocíclicas, um produto do cozimento da carne em altas temperaturas (veja a Seção 12.6), tem sido estimada em 1 µg por quilo de peso corporal por dia; apesar disso, muitos estudos com animais têm sido conduzidos em doses que excedem 10 mg/kg de peso corporal por dia – mais de 10 mil vezes maior. O motivo para se testar nesses níveis altos de dosagem é um desejo de detectar os efeitos biológicos em uma população de várias centenas de animais de laboratório que poderiam normalmente ser observados em apenas alguns indivíduos entre uma população humana de um milhão.)

Ames argumenta que um composto testado na MTD pode muito bem estar exercendo seu efeito matando células em tecidos específicos, com isso provocando proliferação compensatória das células sobreviventes nesses tecidos. Consequentemente, um composto introduzido em um roedor em concentrações próximas a MTD pode estar atuando como um mitogênico tecido-específico e, assim, como um promotor tumoral, quer ou não ele tenha também efeito mutagênico (Seção 11.13). Alternativamente, certas substâncias químicas testadas na MTD po-

dem favorecer a inflamação, mais uma vez favorecendo a progressão do tumor.

A toxicidade e o efeito mitogênico secundário de compostos, naturais ou sintéticos, são geralmente aparentes apenas acima de um certo limiar de dose, abaixo do qual esses efeitos não são detectáveis. Assim, diferentemente dos mutagênicos, cujos poderes para criar mutações no genoma são, provavelmente, uma função linear da dosagem, compostos que agem como promotores de tumor (incluindo os agentes citotóxicos) em geral tem curvas de respostas à dosagem não-lineares (Figura 11.42). Se a verdadeira exposição humana a um composto sendo testado envolve doses efetivas que são milhares de vezes mais baixas que a MTD desse agente e se o efeito carcinogênico que está sendo registrado em roedores deriva primariamente da promoção tumoral (devido à toxicidade na MTD), então os resultados da alta dose em testes com roedores podem não ter qualquer implicação para os riscos de saúde humana. A crítica de Ames dos testes de carcinógenos em MTD permanece um debate acalorado, e a questão está pouco resolvida.



Figura 11.42 Curvas de dose e resposta a agentes genotóxicos e não-genotóxicos. Numerosos estudos têm mostrado que o ônus mutacional infligido por mutagênicos é, até uma certa concentração, linearmente proporcional à dose cumulativa do mutagênico administrado (*linha vermelha*). O risco de câncer, por sua vez, é, provavelmente, linearmente proporcional ao risco infligido pelas mutações. Por exemplo, 1% da dose total de um carcinógeno mutagênico provavelmente gera 1% de risco de carcinogênese. Em contraste, muitos agentes promotores de tumores, incluindo agentes citotóxicos, operam diferentemente (*curva azul*). Como seus efeitos dependem da afinidade de ligação dos promotores a alvos protéicos nas células, os efeitos biológicos induzidos por promotores normalmente geram uma curva sigmóide do tipo indicado. Nesse tipo de resposta à dose, uma vez que a concentração do agente caia abaixo de certo limiar, não há virtualmente efeito biológico. De modo oposto, uma vez que aumentem acima de certo limiar, seus efeitos biológicos são máximos, e não podem aumentar mais. Sendo assim, 1% da dose de tal agente promotor pode induzir muito menos do que 1% do efeito biológico.

Barra lateral 11.16 A sacarina causa câncer? Uma controvérsia científica tem perturbado a comunidade de pesquisadores da carcinogênese química por quase quatro décadas. Em 1970, pesquisadores descobriram que tabletes de sacarina implantados nas bexigas de ratos machos resultavam em um aumento marcante na taxa de câncer de bexiga. Isso resultou em um medo generalizado de que milhões de indivíduos obesos ou diabéticos que estavam usando esse adoçante artificial estivessem expostos a um carcinógeno na sua dieta diária.

Como se mostrou, a evidência apontando para a carcinogenicidade da sacarina era muito peculiar. Ela nunca se registrou como mutagênico no teste de Ames. De fato, uma vez que o íon da sacarina presente em solução é negativamente carregado, ele tem pouca afinidade pelo DNA. Além disso, os efeitos carcinogênicos dos tabletes implantados eram vistos muito depois que a sacarina tinha sido lavada, deixando apenas o veículo usado na construção dos tabletes – o colesterol. Isso sugeriu que a irritação mecânica da parede da bexiga causada por esses tabletes contribuía para a tumorogênese observada. Tumores eram observados apenas quando a sacarina constituía 2,5 ou 5% da dieta total dos ratos machos (essa sendo a dose equivalente àquela de um humano tomando 750 xícaras de café por dia, cada uma com uma pílula de sacarina). O câncer de bexiga não foi observado em nenhuma outra espécie de mamífero exposta à sacarina, incluindo macacos que consumiram doses substanciais por

mais de 20 anos. Camundongos expostos a dieta contendo 7,5% de sacarina não mostraram sinais de câncer de bexiga.

Ratos machos (mas não fêmeas) excretam, em sua urina, grandes quantidades de uma proteína chamada “proteína urinária principal” (MUP); estima-se que a concentração da MUP na urina de rato seja de 100 a 1.000 vezes mais alta do que na urina humana. MUP, atuando junto aos íons de sacarina, disparou a formação de co-precipitados e co-cristais, os quais se acumularam em altas concentrações na bexiga do rato macho. (Esses cristais foram também formados por sais de outros ácidos ionizados, os quais também foram efetivos promotores tumorais na bexiga de ratos machos.) Esses precipitados atuaram na irritação e inflamação de células do urotélio dos ratos machos – o epitélio especializado que reveste a bexiga –, gerando um efeito promotor de tumor.

Experimentos como esses ilustram os riscos dos testes de carcinógenos em modelos com roedores. É muito difundido, mas ainda não é um consenso universal na comunidade de pesquisa do câncer, que a sacarina é totalmente inofensiva. Trinta anos após o início dessa controvérsia, não há ainda evidências epidemiológicas de que o vasto número de diabéticos que experimentam a exposição crônica a sacarina por muitos anos sofreram algum aumento do risco de desenvolver carcinomas de bexiga. (O adoçante continua banido no Canadá e na Califórnia!) Então, promotores tumorais trabalham de forma estranha e complexa, e comparações interespecíficas para detectá-los são perigosas.

HCV. Esses números indicam o enorme benefício que pode derivar da prevenção dessas doenças virais.

Processos inflamatórios estão também implicados na promoção de vários tipos de cânceres humanos não-virais. Nesses casos, as oportunidades de desenvolver drogas anticâncer futuras derivam dos recentes avanços na elucidação de detalhes bioquímicos da inflamação e de suas contribuições específicas na promoção tumoral. A cicloxigenase-2 (COX-2) está claramente no centro desse processo, e vários agentes antiinflamatórios (i. e., NSAIDs) destinados a essa enzima são conhecidos por serem efetivos no decréscimo de vários tipos de câncer. Infelizmente, no entanto, o uso por períodos longos de alguns desses agentes induz efeitos colaterais inaceitáveis em alguns indivíduos, incluindo complicações cardiovasculares fatais. Presumivelmente, esses efeitos colaterais são devidos ao fato de que a COX-2 gera um número de prostaglandinas distinto, e cada uma dessas induz múltiplas repostas celulares *downstream*.

Tabela 11.4 Ligações entre a inflamação e a patogênese do câncer

Muitas condições inflamatórias predispoem ao câncer
Cânceres aparecem em locais com inflamação crônica
Polimorfismos funcionais de genes da citocina estão associados com a suscetibilidade e gravidade do câncer
Populações distintas de células inflamatórias são detectadas em muitos cânceres
A infiltração de macrófagos associada com a extensão do tumor está correlacionada com o prognóstico
Citocinas inflamatórias são detectadas em muitos cânceres; altos níveis estão associados com um mau prognóstico
Quimiocitocinas são detectadas em muitos cânceres, elas estão associadas com o infiltrado inflamatório e com a motilidade celular
A anulação das citocinas e quimiocitocinas protege dos carcinógenos, de metástases experimentais e síndrome linfoproliferativa
Citocinas inflamatórias estão implicadas na ação de carcinógenos não-geotóxicos do fígado
O fator de necrose tumoral da citocina inflamatória é diretamente transformante <i>in vitro</i>
O uso a longo prazo de NSAID diminui a mortalidade pelo câncer colorretal

Cortesia de F. Balkwill; de F. Balkwill e A. Mantovani, *Lancet* 357: 539-545, 2001.

Entretanto, as perspectivas são brilhantes para o desenvolvimento de potentes agentes anticâncer que tenham atividade **profilática** (preventiva) e terapêutica que afetem a via da COX-2, mas não criem os efeitos colaterais associados ao uso a longo prazo das NSAIDs. Assim, sabe-se que o produto-chave da ação da COX-2 na promoção tumoral, a prostaglandina E_2 (PGE_2), se liga e ativa pelo menos oito diferentes receptores tipo serpentina da superfície celular (veja as Seções 5.7 e 6.11), e cada qual presumivelmente evoca o seu próprio subconjunto de respostas *downstream*. Portanto, o desenvolvimento de drogas bastante específicas com o propósito de inibir um ou outro desses receptores provavelmente gerará agentes com efeitos significativos na redução da promoção tumoral associada à inflamação, e com poucos efeitos colaterais associados aos antagonistas da COX-2 de ampla atuação.

O estrogênio, a progesterona e os androgênios aparecem indistintamente na maioria das discussões sobre o câncer humano, porque têm papéis críticos na patogênese dos carcinomas de mama, endométrio e próstata. Juntos, esses tumores somam cerca de 9% de toda a mortalidade por neoplasias no ocidente. Esses hormônios atuam estimulando a proliferação das células epiteliais nos tecidos que respondem a eles e, portanto, podemos incluí-las em nosso esquema conceitual de inicialização e promoção tumoral. Outro hormônio sistêmico – IGF-1 (fator de crescimento 1 semelhante à insulina) – parece também funcionar como um importante promotor tumoral, porque protege as células pré-malignas da apoptose e pode, também, estimular a sua proliferação.

De forma significativa, esses hormônios continuam tendo papéis importantes na tumorigênese, uma vez que a progressão tumoral de múltiplas etapas tenha gerado malignidades maduras. A proliferação das células cancerosas em muitos tumores de mama bem-estabelecidos, e em praticamente todos os tumores de próstata, depende da contínua presença de estrogênios e androgênios, respectivamente. A presença contínua do IGF-1 também parece ser requerida por vários tumores recém-formados. Essa dependência para a progressão destaca uma questão mais geral que continua relativamente inexplorada pelos pesquisadores do câncer: em qual extensão uma variedade de malignidades, uma vez formadas, continua a depender de promotores tumorais que ajudou a criá-las?

Podemos colocar uma questão diferente, mas relacionada: os tumores maduros continuam a depender dos alelos mutantes que foram criados décadas antes pelos mutagênicos iniciadores? Ou essas mutações anteriores, as quais ocorrem como passo inicial para a progressão tumoral, se tornam irrelevantes depois, quando, subsequente, os alelos mutantes adquiridos assumem o trabalho de programar a proliferação das células cancerosas?

As respostas mais diretas para essa questão vêm de experimentos com modelos do desenvolvimento do câncer em camundongos, em particular camundongos transgênicos nos quais certos oncogenes são ativados em tecidos específicos; essas ativações gênicas levam, finalmente, a tumores nesses tecidos. Em alguns desses modelos de camundongo, transgenes iniciadores, como *myc* e *ras*, tinham sido inativados por uma variedade de meios muito depois que tumores substanciais tivessem sido formados. Os efeitos no crescimento tumoral que têm sido observados até agora são conflitantes.

Em geral, esses tumores colabam rapidamente quando destituídos dos oncogenes que, originalmente, levaram à sua formação. Por isso, nesses casos, os alelos oncogênicos mutantes foram importantes para a *inicialização* do estado canceroso, assim como, muito mais tarde, para sua *manutenção*. Explicado de forma diferente, os alelos mutantes que foram acumulados em passos posteriores da tumorigênese de múltiplas etapas não tornam os anteriores desnecessários. No entanto, em vários relatórios de pesquisa, o desligamento dos oncogenes iniciadores *neu*, *myc* ou *wnt* após a formação dos tumores levou, após curtas reduções, ao crescimento desses tumores novamente. Nesses casos, os oncogenes iniciadores não eram mais requeridos para a expansão dos tumores recorrentes.

Podemos assumir, no momento, que esses vários modelos de formação dos cânceres de camundongo refletem os mecanismos operando nos humanos da mesma forma. Se for assim,

esses efeitos observados do desligamento dos oncogenes iniciadores guardam profundas implicações para o desenvolvimento de novos tipos de terapêutica do câncer, um tópico que retomaremos no Capítulo 16. Por exemplo, se um alelo *ras* mutante é encontrado no genoma de uma célula tumoral, esse tumor pode ser curado por drogas dirigidas para a oncoproteína Ras, ou essa oncoproteína, que pode ter tido um papel-chave na inicialização da formação tumoral, terá se tornando irrelevante, posteriormente, à proliferação e à sobrevivência das células desse tumor?

O vasto número de alterações genéticas presentes nos genomas de células cancerosas humanas complica muito a maior meta das pesquisas atuais do câncer: descrições da “biografia genética” de vários tipos de tumores humanos – a sucessão de alterações genéticas que programam o fenótipo neoplásico das células nesses tumores. O número de seqüências de DNA alteradas nos genomas da maioria dos tipos de células dos cânceres humanos claramente faz parecer menor o pequeno número de alterações genéticas (e metilações do promotor) que têm papel causal dando seqüência a progressão tumoral. No presente, possuímos apenas ferramentas rudimentares para “distinguir o trigo do joio” – o pequeno número de mudanças genéticas biologicamente importantes da grande multidão de mudanças genéticas irrelevantes que estão presentes no genoma de praticamente todas as células cancerosas humanas.

Apesar desses problemas verdadeiramente intimidadores, há otimismo para que logo possamos ser capazes de formular alguns princípios organizadores básicos que coloquem todos os tipos de tumores humanos sob um teto conceitual comum. Uma vez que esses princípios estejam bem-estabelecidos, seremos capazes de usá-los para explicar por que vários tumores humanos adquirem certas combinações de genes mutantes (e metilados). Especificamente, exames dos fenótipos de uma variedade de tipos de tumores humanos têm levado à proposição de que todas as células de cânceres humanos muito avançados compartilham um número comum de atributos essenciais que elas adquiriram na rota para os estados de malignidade. Esses são (1) a redução da dependência de fatores de crescimento mitogênicos exógenos (Capítulos 5 e 6); (2) a resistência adquirida a sinais inibitórios de crescimento, como aqueles fornecidos pelo TGF- β (Capítulo 8), (3) a habilidade de multiplicar indefinidamente, isto é, a proliferação de células imortalizadas (Capítulo 10); (4) a suscetibilidade reduzida a apoptose (Capítulo 9); (5) a habilidade de gerar novos vasos sanguíneos – angiogênese (Capítulo 13); (6) a aquisição de habilidade invasiva e metastática (Capítulo 14); e uma sétima que permanece um pouco menos documentada: (7) a habilidade de escapar da eliminação pelo sistema imune (Capítulo 15).

Verdadeiramente, algumas das observações descritas neste capítulo sustentam muito ainda outro atributo compartilhado. Nossa discussão da evolução e sucessão clonal levou a concluir que, para que esses eventos ocorram em uma frequência razoável, as taxas de mutações nas populações de células-tronco tumorais devem ser anormalmente altas. Na ausência dessa mutabilidade aumentada, as células-clone podem não acumular as alterações genéticas múltiplas durante o tempo de vida humano que são requeridas para formação do câncer. Juntas, essas especulações e observações convergem para um oitavo atributo que pode muito bem ser compartilhado por praticamente todos os genomas das células cancerosas humanas: (8) aquisição da instabilidade genômica (Capítulo 12).

Se aceitarmos essa lista pelo menos como uma tentativa, precisaremos relacionar a aquisição de cada um desses traços a passos específicos da progressão tumoral de múltiplas etapas. Por exemplo, poderíamos assumir que cada passo na progressão de um tumor humano é marcado por uma alteração de um gene distinto, conseguida seja por meio de mutação genética ou de metilação epigenética. Além disso, podemos imaginar que cada um dos passos na progressão tumoral gera um dos 7 ou 8 atributos listados anteriormente. Isso poderia criar um cenário de um gene – um fenótipo que poderia simplificar muito nossa compreensão sobre a progressão de tumores humanos.

Apesar de atraente, tal pensamento é simples, uma vez que não há um mapeamento um-para-um entre alterações específicas em um gene e a mudança correspondente no fenótipo da

célula. Em vez disso, muitos dos fenótipos das células cancerosas são conseguidos por meio da colaboração da ação de vários genes ou alterações genéticas (Figura 11.43). Por exemplo, a resistência adquirida a apoptose por células cancerosas humanas geralmente resulta da ativação da via de sinalização de Ras (a qual ativa energeticamente a cinase antiapoptótica PKB/Akt), assim como da inativação da via de sinalização da p53.

Do mesmo modo, a mutação de certos genes cancerosos que agem pleiotropicamente pode conferir vários benefícios fenotípicos distintos simultaneamente. Assim, a formação de um oncogene *myc* pode concomitantemente desregular a via de sinalização de pRb (a qual em geral permite às células responder normalmente aos sinais inibitórios de crescimento), auxiliar na desrepressão do gene *hTERT* (o qual permite a imortalização da célula) e reduzir a dependência da célula ao mitógeno. Então, a esperança de um esquema simples é frustrada pela realidade biológica de como cada um desses genes e proteínas codificadas verdadeiramente opera.

Conhecendo essa complexidade, poderíamos ainda desejar uma outra tentativa de tipo de mapeamento. Poderíamos imaginar que cada fenótipo biológico das células cancerosas é um resultado direto de um subcircuito regulatório que governa a vida da célula (Figura 11.44). Se for assim, talvez possamos explicar a progressão tumoral como uma desregulação progressiva de um número de subcircuitos distintos na célula.

Um exame da Figura 11.44 nos dá algum encorajamento. Por exemplo, a aquisição da independência de mitógenos é adquirida basicamente pela ativação do receptor de tirosina cinase (RTK)→Ras→via do MAPK, enquanto a resistência a apoptose é adquirida por meio de lesões no subcircuito que governa a morte celular programada. Outro atributo adquirido pode também estar relacionado a porções distintas do diagrama desse grande circuito. Ainda, mesmo aqui não há clareza e compartimentalização simples, porque há numerosas conexões cruzadas entre os vários subcircuitos que operam nas células. Além disso, vários subcircuitos geralmente colaboram para criar fenótipos distintos de células cancerosas.

Entretanto, com todas essas limitações em mente, a Figura 11.44 e outras como ela inspiram uma esperança que pode muito bem se realizar em algum momento durante as primeiras décadas deste novo milênio: em algum ponto, entenderemos verdadeiramente em detalhe como cada um desses subcircuitos opera para regular o fenótipo da célula. Estaremos aptos a modelar as operações de cada um matematicamente. Seremos capazes de ponderar o comportamento das células cancerosas como um todo em termos das interações de defeitos moleculares específicos em cada um desses circuitos regulatórios.

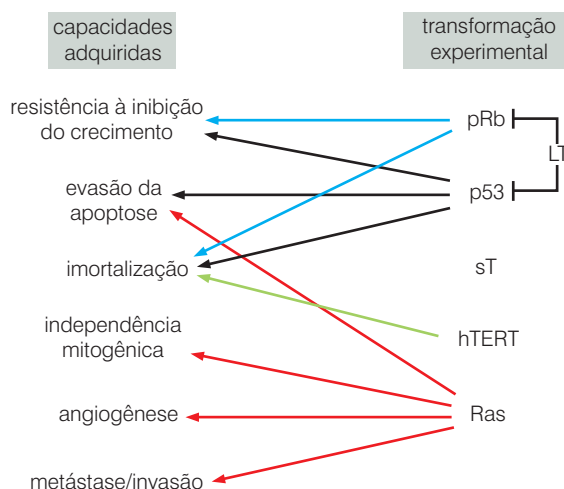


Figura 11.43 Células cancerosas: genótipos versus fenótipos Durante o curso da progressão tumoral, as células humanas adquirem vários fenótipos associados ao câncer. Independentemente disso, experimentos em laboratório revelam que diversos genes distintos devem ser introduzidos nas células humanas para levá-las a um estado tumorigênico. Isso levanta a questão de como cada um desses genes introduzidos contribui com os fenótipos celulares associados à tumorigenicidade. Como indicado aqui, genes como aquele que codifica para hTERT, a subunidade catalítica da telomerase, afetam apenas o fenótipo da imortalização, enquanto outros genes, como o gene que codifica a p53, afetam pelo menos três fenótipos distintos – resistência à inibição do crescimento, evasão da apoptose e imortalização. A proteína de ação mais abrangente é, provavelmente, a Ras, a qual afeta a suscetibilidade à apoptose, a dependência a mitógenos exógenos, a angiogênese e a habilidade invasiva/metastática. Por isso, um mapeamento um-para-um entre genes e fenótipos associados ao câncer não é possível.

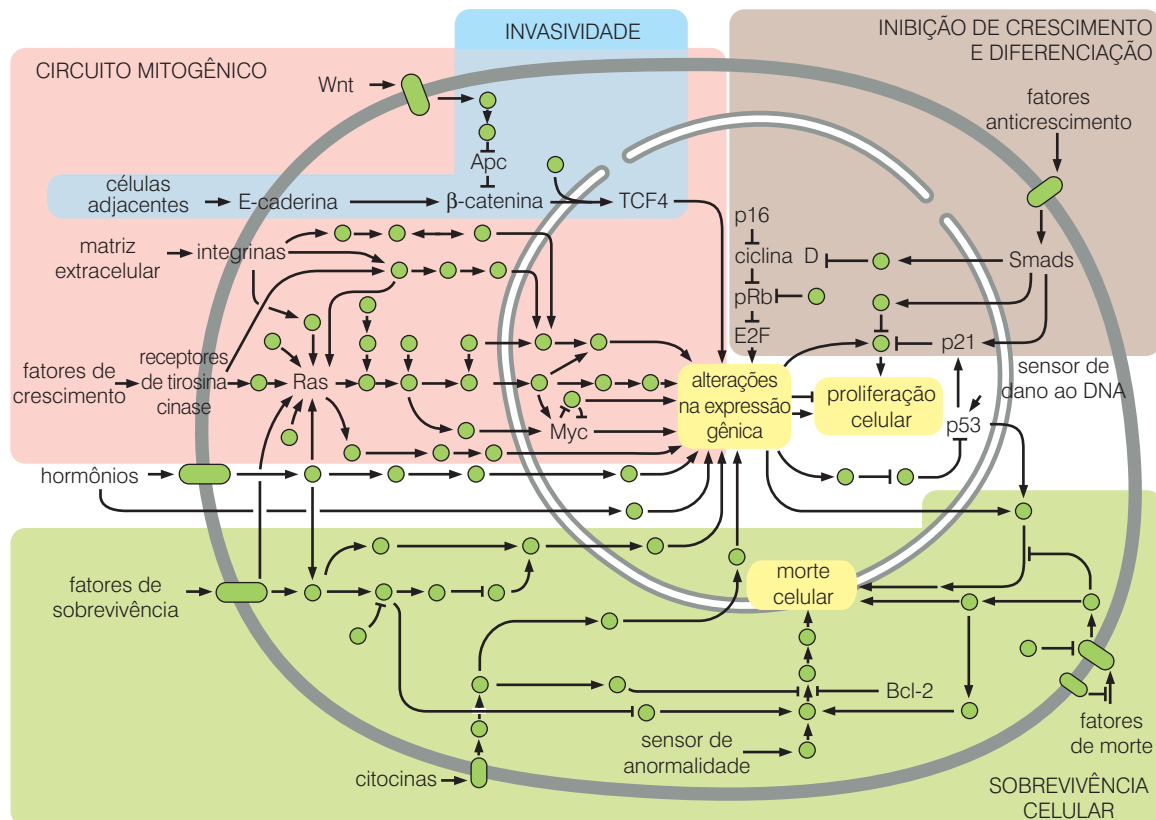


Figura 11.44 O circuito de sinalização intracelular e a colaboração entre os genes associados ao câncer O desenho do circuito de transdução de sinal em células de mamíferos foi revelado, parte por parte, no quarto de século passado. Este diagrama indica apenas uma porção das proteínas que desempenham papéis críticos na modulação do fluxo de sinais através de vários circuitos operando em nossas células. Como indicado aqui por vários sombreamentos, diferentes subcircuitos estão envolvidos na regulação de processos fisiológicos celulares distintos. Assim, o circuito mitogênico, crescimento-promoção (*vermelho-claro*), o circuito governando os sinais de inibição de crescimento (*marrom-claro*), o circuito

governando a apoptose (*verde-claro*) e o circuito governando a invasividade e a metástase (*azul-claro*) podem ser especificados a regiões distintas do mapa do circuito-mestre da célula de mamífero. (Note que o circuito governando a mitogênese se sobrepõe em parte ao circuito governando a invasividade da célula cancerosa, um indicativo do fato de que um conjunto comum de proteínas medeia ambas as respostas biológicas.) Presumivelmente, a modelagem matemática desses vários circuitos um dia proverá uma base mecanicista de por que a tumorogênese é um evento de múltiplas etapas em mamíferos. (Adaptada de D. Hanabán e R.A. Weinberg, *Cell* 100: 57-70, 2000.)

Fechamos este capítulo recordando o oitavo atributo que foi dado às células do câncer – a aquisição de genomas mutáveis. Dada a baixa probabilidade de cada passo individual na progressão tumoral, a conclusão do processo como um todo se torna extremamente improvável; mesmo assim, os cânceres ocorrem com uma frequência substancial na população humana. O próximo capítulo está focado em tentativas de resolver esse dilema e revelar como um processo de doença impossível matematicamente se torna, de modo bastante frequente, a causa de 20% da mortalidade humana.

Conceitos-chave

- O processo de formação tumoral é um complexo de múltiplas etapas envolvendo alterações múltiplas das células e dos mecanismos de controle fisiológico.
- A complexidade desse processo é refletida pelos longos períodos requeridos pela maioria dos cânceres humanos para se desenvolverem.
- Essas mudanças envolvem a ativação de oncogenes e a inativação de genes supressores de tumor.

- O número de passos requeridos para transformar experimentalmente células humanas é maior do que aquele necessário para transformar células de camundongos de laboratório.
- Essas alterações afetam múltiplos circuitos regulatórios distintos nas células e funcionam de modo complementar para criar o fenótipo celular neoplásico.
- Algumas dessas mudanças ocorrem como resultado direto das ações de mutagênicos exógenos, e a exposição a esses mutagênicos pode representar um “limitante da taxa” determinante da progressão tumoral.
- Em várias ocasiões, no entanto, a taxa de progressão tumoral pode ser governada pela ação de agentes promotores não-mutagênicos, os quais podem determinar a taxa de expansão dos clones de células mutantes.
- Em vários cânceres humanos, esses estímulos não-mutagênicos críticos e promotores de tumor incluem a estimulação mitogênica e a inflamação crônica.
- A multiplicidade de passos requerida para o aparecimento de cânceres humanos não é conhecida, em parte porque certas mudanças podem ocorrer rapidamente e, portanto, podem não ser “limitantes da taxa”, enquanto outras podem requerer uma década ou mais para se completar.
- A progressão tumoral de múltiplas etapas pode ser descrita como uma forma de evolução darwiniana ocorrendo nos tecidos. No entanto, como algumas mudanças críticas ocorrendo durante a tumorigênese são epigenéticas e como a taxa de diversificação genética pode ocorrer muito rapidamente, as descrições clássicas da evolução darwiniana precisam ser modificadas.
- Na maioria, mas não em todos os modelos transgênicos de tumorigênese, as alterações da inicialização continuam a ser requeridas para a progressão tumoral, muito depois que esse processo tenha sido completado.
- O número de mudanças genéticas encontrado nos genomas de células cancerosas humanas excede muito o número requerido para que a tumorigênese se complete, complicando a identificação das mudanças críticas que são casualmente importantes na formação do tumor.
- A descoberta de células-tronco cancerosas muda muito nossos conceitos sobre os mecanismos da tumorigênese de múltiplas etapas, uma vez que essas células auto-renovantes, mais propriamente do que a massa populacional de células cancerosas, podem ser os objetos de alterações genéticas e seleção clonal.

Questões elaboradas

1. Conhecendo as várias modificações genéticas e epigenéticas que ocorrem durante a tumorigênese de múltiplas etapas, quais delas você diria que são provavelmente descobertas prontamente e quais podem ser difíceis de identificar? Descreva as razões para essas alegações.
2. Alguns dos genes supressores de tumor inativados durante a tumorigênese de múltiplas etapas podem ser prontamente identificados devido a LOH na região cromossomal que os carrega, enquanto outros podem ser difíceis de identificar dessa maneira. Descreva os fatores que permitem e aqueles que complicam essa identificação.
3. Quais são os argumentos a favor da noção de que todos nós carregamos uma miríade de clones de células inicializadas pré-malignas por todo o corpo?
4. Quais os argumentos que podem ser reunidos que favorecem a noção de que a maior parte dos carcinógenos humanos atua mais como promotores do que como iniciadores da tumorigênese?
5. Quais as diferentes abordagens que podem ser usadas para estimar o número de passos na progressão tumoral de múltiplas etapas e como cada uma dessas abordagens falhou?
6. Como a informação atual disponível sobre a progressão tumoral de múltiplas etapas pode fornecer pistas sobre as estratégias de prevenção de tumores detectáveis clinicamente?
7. Quais os mecanismos que permitem a infecções virais crônicas exercerem uma influência carcinogênica em um tecido?
8. Descreva os vários mecanismos da promoção tumoral e os traços que eles compartilham em comum e aqueles que os distinguem.

Leitura adicional

- Adams JM & Cory S (1992) Oncogene co-operation in leukaemogenesis. *Cancer Surveys* 15, *Oncogenes in the Development of Leukemia*, 119–141.
- Aggarwal BB (2004) Nuclear factor- κ B. The enemy within. *Cancer Cell* 6, 203–208.
- Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A et al. (2003) Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 3983–3988.
- Al-Hajj M & Clarke ME (2004) Self-renewal and solid tumor stem cells. *Oncogene* 23:7274–7282.
- Armitage P & Doll R (1954) The age distribution of cancer and a multistage theory of carcinogenesis. *Brit. J. Cancer* 8, 1–12.
- Balkwill F (2004) Cancer and the chemokine network. *Nat. Rev. Cancer* 4, 540–550.
- Boland CR & Ricciardiello L (1999) How many mutations does it take to make a tumor? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 14675–14677.
- Braakhuis BJM, Tabor MP, Kummer JA et al (2003) A genetic explanation of Slaughter's concept of field cancerization: evidence and clinical implications. *Cancer Res.* 63, 1727–1730.
- Buendia MA (1992) Hepatitis B virus and hepatocellular carcinoma. *Adv. Cancer Res.* 59, 167–226.
- Cairns J (1975) Mutation, selection and the natural history of cancer. *Nature* 255, 197–200.
- Clevers H (2004) At the crossroads of inflammation and cancer. *Cell* 118, 671–674.
- Cohen SM & Ellwein LB (1990) Cell proliferation in carcinogenesis. *Science* 249, 1007–1011.
- Coussens LM & Werb Z (2001) Inflammatory cells and cancer: think different! *J. Exp. Med.* 193, F23–F26.
- Coussens LM & Werb Z (2002) Inflammation and cancer. *Nature* 420, 860–867.
- Dick JE (2003) Breast cancer stem cells revealed. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 3547–3549.
- Glick AB & Yuspa SH (2005) Tissue homeostasis and the control of the neoplastic phenotype in epithelial cancers. *Semin. Cancer Biol.* 15, 75–83.
- Gold LS, Ames BN & Slone TH (2002) Misconceptions about the causes of cancer. In *Human and Environmental Risk Assessment: Theory and Practice* (D Paustenbach ed), pp 1415–1460. New York: John Wiley & Sons.
- Grady WM & Markowitz SD (2002) Genetic and epigenetic alterations in colon cancer. *Ann. Rev. Genomics Hum. Genet.* 3, 101–128.
- Gupta RA & DuBois RN (2001) Colorectal cancer prevention and treatment by inhibition of cyclooxygenase-2. *Nat. Rev. Cancer* 1, 11–19.
- Hahn WC & Weinberg RA (2002) Rules for making human tumor cells. *N. Engl. J. Med.* 347, 1593–1603.
- Hahn WC & Weinberg RA (2002) Modelling the molecular circuitry of cancer. *Nat. Rev. Cancer* 2, 331–341.
- Hanahan D (1989) Transgenic mice as probes into complex systems. *Science* 246, 1265–1275.
- Hanahan D & Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57–70.
- Hansel DE, Kern SE & Hruban RH (2003) Molecular pathogenesis of pancreatic cancer. *Ann. Rev. Genomics Hum. Genet.* 4, 237–256.
- Henderson BE & Feigelson HS (2000) Hormonal carcinogenesis. *Carcinogenesis* 21, 427–433.
- Hunter T (1991) Cooperation between oncogenes. *Cell* 64, 249–270.
- Huntly BJP & Gilliland DG (2004) Blasts from the past: new lessons in stem cell biology from chronic myelogenous leukemia. *Cancer Cell* 6, 199–201.
- Hussain SP, Hofseth LJ & Harris CC (2003) Radical causes of cancer. *Nat. Rev. Cancer* 3, 276–285.
- Janssens V, Goris J & Van Hoof C (2005) PP2A: the expected tumor suppressor. *Curr Opin. Genet. Dev.* 15, 34–41.
- Kelly LM & Gilliland DG (2002) Genetics of myeloid leukemias *Ann. Rev. Genomics Hum. Genet.* 3, 179–198.
- Kern S, Hruban RH, Hidalgo M & Yeo CJ (2002) An introduction to pancreatic adenocarcinoma genetics, pathology and therapy. *Cancer Biol. Therapy* 1, 607–613.
- Knudson AG (2001) Two genetic hits (more or less) to cancer. *Nat. Rev. Cancer* 1, 157–162.
- Marx J. (2003) Mutant stem cells may seed cancer. *Science* 301, 1308–1310.
- Miller EC (1978) Some current perspectives on chemical carcinogenesis in humans and experimental animals: presidential address. *Cancer Res.* 38, 1479–1496.
- Moore MA & Tsuda H (1998) Chronically elevated proliferation as a risk factor for neoplasia. *Eur J. Cancer Prev.* 7, 353–385.
- Nowell PC (1976). The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 194, 23–28.
- Pardal R, Clarke MF & Morrison SJ (2003) Applying the principles of stem-cell biology to cancer. *Nat. Rev. Cancer* 3, 895–902.
- Parsonnet J (ed) (1999) *Microbes and Malignancy: Infection as a Cause of Human Cancers*. Oxford, UK: Oxford University Press, New York.
- Renan MJ (1997) How many mutations are required for tumorigenesis? Implications from human cancer data. *Mol. Carcinogenesis* 7, 139–146.
- Reya T, Morrison SJ, Clarke MF & Weissman IL (2001) Stem cells, cancer and cancer stem cells. *Nature* 414, 105–111.
- Thun MJ, Henley SJ & Calle EE (2002) Tobacco use and cancer: an epidemiologic perspective for geneticists. *Oncogene* 21, 7307–7325.
- Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR et al. (1988) Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N. Engl. J. Med.* 319, 525–532.
- Vogelstein B & Kinzler KW (eds) (1998) *The Genetic Basis of Human Cancer*. New York: McGraw-Hill.
- Yuspa SH (1994) The pathogenesis of squamous cell cancer: lessons learned from studies of skin carcinogenesis. *Cancer Res.* 54, 1178–1189.
- Zha S (2004) Cyclooxygenases in cancer: progress and perspective. *Cancer Lett.* 215, 1–20.
- Zhao II, Roberts TM & Hahn WC (2004) Functional genetics and experimental models of human cancer. *Trends Mol. Med.* 10, 344–350.
- zur Hausen H (1991) Viruses in human cancers. *Science* 254, 1167–1173.

A large, circular inset in the top right corner shows a fluorescence microscopy image of cells. The cells are stained with green and red dyes, highlighting internal structures like the nucleus and cytoplasm. The background of the page is a grayscale image of a cell, with the circular inset providing a colorized, detailed view of a specific area.

CAPÍTULO 12

Manutenção da Integridade Genômica e o Desenvolvimento de Câncer

“Quando interpretados pela primeira vez, as ramificações do DNA e o código genético... Nós esquecemos completamente o possível papel de enzimas no reparo... Depois eu entendi que o DNA é de tal forma precioso que provavelmente muitos mecanismos distintos de reparo poderiam existir.”

Francis H. C. Crick, biólogo molecular, 1974.

“A capacidade de se enganar sutilmente é a verdadeira maravilha do DNA. Sem esse atributo especial, nós ainda seríamos bactérias anaeróbicas, e não haveria música.”

Lewis Thomas, biólogo, 1979.

O fato de que a formação de tumores humanos é um processo complexo, com diversos passos, significa que múltiplas linhas de defesa contra o câncer devem ter sido estabelecidas em nossas células, cada uma mantida por um circuito regulatório complexo. O corpo humano – na verdade, suas células individuais – devem confiar a essas defesas anticâncer a manutenção de seu constituinte mais estável e fidedigno: as moléculas de DNA. Por longos períodos, as seqüências de DNA são os componentes mais fixos e imutáveis de uma célula; muitas outras partes estão em fluxo constante, sendo criadas e quebradas continuamente.

De acordo com essa lógica, é realmente a estabilidade das moléculas de DNA que reforça as defesas anticâncer mais robustas. Devido ao fato de haver múltiplas linhas de defesa que

dependem da estabilidade do DNA, e já que para encontrar uma brecha nessa defesa geralmente a ocorrência de um raro evento mutacional é necessária, a probabilidade de as populações celulares prosseguirem todo o caminho até um estado neoplásico deve ser astronômica-mente pequena.

Dessa forma, alguém com fobia ao câncer pode descansar tranquilo à noite, confiante na multiplicidade celular e nos mecanismos de defesa que a evolução montou para nos proteger de neoplasias. Porém, existe uma conflitante inconsistência aqui: se o número de mecanismos de defesa anticâncer fosse realmente tão eficiente como demonstrado neste texto, e o rompimento dessas defesas fosse normalmente dependente de eventos raros de mutação, os cânceres jamais afetariam as populações humanas. Ainda assim, eles afetam. Em populações ocidentais, nas quais as mortes por doenças infecciosas são relativamente pouco frequentes, por volta de uma pessoa em cinco está destinada a morrer de algum tipo de câncer. Assim, a população celular do câncer consegue o que parece impossível – adquirindo uma quantidade substancial de alelos mutantes (e metilados) durante um período de algumas décadas.

Pesquisadores trabalhando em Seattle, Washington, tentaram resolver esta inconsistência já em 1974. Eles propuseram que a única solução para esse dilema lógico deveria depender de um aumento drástico na taxa de mutação: as populações celulares a caminho de se tornarem malignas deveriam possuir genomas que eram mais suscetíveis à mutação do que os genomas de células normais – uma condição às vezes chamada de *fenótipo mutante*. Tais especulações receberam grande apoio recentemente, já que tipos diferentes de instabilidade genética foram documentados nos genomas de células de câncer.

Neste capítulo, direcionaremos grande parte de nossa atenção para dois problemas importantes. Primeiro, como células e tecidos humanos normais conseguem manter as taxas de mutação tão lentas? E, segundo, quais são as estratégias para suprimir as mutações que surgem durante a patogênese do câncer em humanos?

12.1 Os tecidos são organizados para minimizar o acúmulo progressivo de mutações

Em diversas ocasiões durante este texto, descrevemos os efeitos de carcinomas e promotores de tumor em células-alvo em todo o corpo. No entanto, as identidades biológicas específicas dessas células-alvo nunca foram explicitadas. Como resultado, o conhecimento da natureza dessas células é crítico para o entendimento de como a integridade do genoma é mantida. Para explorar este assunto, precisamos adentrar profundamente a organização de tecidos e os vários tipos celulares que formam tecidos. Seu comportamento biológico nos fornece esclarecimentos das estratégias exploradas pelos tecidos e células para minimizar o acúmulo de lesões genéticas.

Conforme descrito anteriormente (Seção 11.6), um esquema bastante comum parece explicar a construção e manutenção de muitos tecidos em todo o corpo. Em cada tecido, um número relativamente pequeno de células habita seu **compartimento** de células-tronco. Essas células auto-renovadoras podem constituir uma fração mínima de toda a população celular de um tecido, algumas vezes tão pouco quanto 0,1 a 1% do total de células. Na verdade, na maioria dos tecidos, esses números representam nada mais do que palpites pobremente estimados. Já que essas células-tronco estão presentes em números bastante reduzidos, possuem uma aparência não particularmente distinta e estão frequentemente espalhadas entre outras células de um tecido, elas são difíceis de serem identificadas e estudadas. Como consequência, muito do que está descrito a seguir é baseado em inferências, em vez de em observação direta das células-tronco e suas propriedades.

Iremos revisar brevemente as discussões do Capítulo 11 acerca de células-tronco. Agora, no entanto, nosso foco serão as células-tronco *normais* dos tecidos, em vez do conjunto de células-tronco *cancerosas* que residem dentro de um tumor. Como no caso dos tumores, as

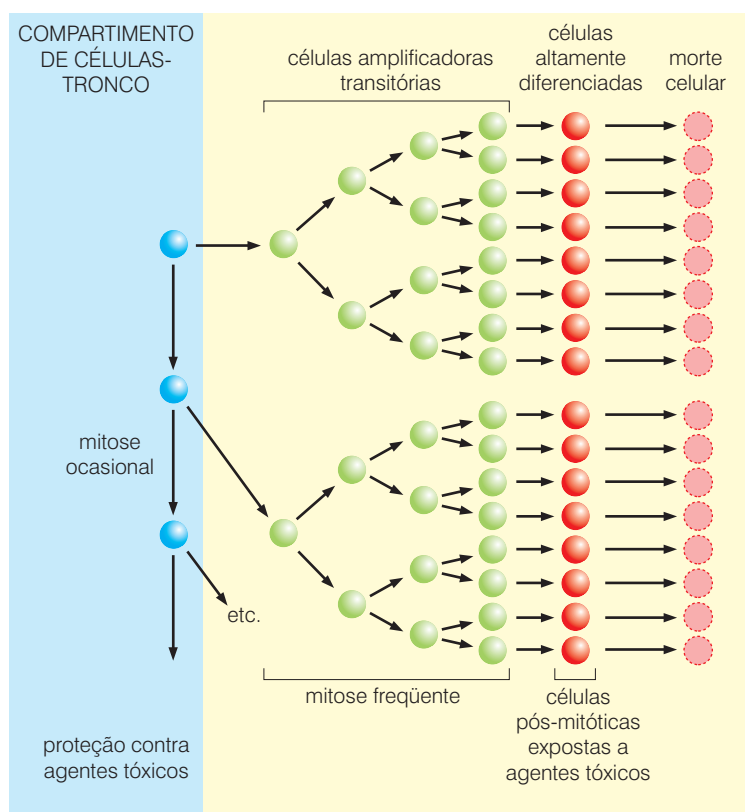


Figura 12.1 Organização tecidual e proteção do genoma de células-tronco A organização de muitos tecidos epiteliais parece estar de acordo com o esquema mostrado aqui. Conforme indicado, cada célula-tronco (azul) divide-se apenas ocasionalmente, de modo assimétrico, para gerar uma nova célula-tronco filha e uma célula-filha amplificadora transitória. Estas células-tronco com frequência estão anatomicamente protegidas de agentes tóxicos. As células-filhas amplificadoras transitórias (verde) sofrem ciclos repetidos de crescimento e divisão, expandindo-se exponencialmente. Finalmente, os produtos dessas divisões são diferenciados para formar células pós-mitóticas, altamente diferenciadas (vermelho). As células altamente diferenciadas, que estão frequentemente em contato com diversos agentes tóxicos, são afetadas com certa frequência; então, qualquer alelo mutante que surja nessas células será perdido, cedo ou tarde, e não mais fará parte do tecido. Isso significa que os genomas das células-tronco são protegidos por meio de dois mecanismos: as células-tronco raramente se dividem, e essas células são anatomicamente protegidas de influências nocivas, potencialmente mutagênicas.

células-tronco em um tecido normal são auto-renovadoras, já que ao menos uma de duas células-filhas de uma célula-tronco em divisão irá reter o fenótipo exibido pela célula-mãe antes da divisão. Em muitos tecidos, a segunda célula-filha e seus descendentes em amplificação passarão por um número substancial de divisões celulares antes de entrar em um estado pós-mitótico, altamente diferenciado. Essas células ativamente em divisão, que servem como intermediárias entre uma célula-tronco e seus descendentes diferenciados, podem, por sua vez, gerar dezenas e até centenas de descendentes diferenciados da segunda célula-filha (Figura 12.1).

O aumento exponencial no número de células amplificadoras transitórias significa que uma célula-tronco necessita se dividir apenas em ocasiões raras, para manter um grupo significativo de células no estágio final, altamente diferenciado, no tecido. Assim, se poderia pensar que as células-tronco participam de ciclos contínuos de crescimento e divisão, mas o que frequentemente ocorre na realidade é bastante diferente: as células amplificadoras transitórias representam a maior parte da atividade mitótica na maioria dos tecidos. Já que a replicação do DNA que ocorre durante cada ciclo celular é inerentemente capaz de possuir erros, esse esquema reduz o risco de que mutações acumulem-se nos genomas das células-tronco de um tecido.

Em muitos tecidos epiteliais, as células epiteliais diferenciadas são especialmente vulneráveis ao dano, já que elas formam a camada de células que contornam as paredes de diversos ductos e cavidades contendo materiais tóxicos. Nos casos do cólon e dos ductos biliares, as células epiteliais confrontam o conteúdo fecal e a bile altamente corrosiva, respectivamente. As células que circundam os alvéolos pulmonares convivem diariamente com partículas e poluentes do ar. Os queratinócitos de nossa pele são expostos diretamente ao mundo exterior, sendo propensos a sofrerem diversos tipos de danos, incluindo aqueles infligidos pela radiação ultravioleta.

As células diferenciadas de último estágio (veja a Figura 12.1), nesses e em outros tecidos, possuem um tempo de vida finito e são descartadas cedo ou tarde. Alguns tipos celulares

podem simplesmente envelhecer e perder sua viabilidade, sendo removidos da participação nas atividades ativas do tecido. Por exemplo, células vermelhas do sangue possuem um tempo de vida médio de aproximadamente 120 dias, após os quais elas são captadas pelo baço e quebradas, tendo seu conteúdo reciclado ou excretado. As células epiteliais do cólon vivem por 5 a 7 dias antes de serem induzidas a entrar em processo de apoptose e serem descartadas no lúmen do intestino. Os queratinócitos de nossa pele morrem em 20 a 30 dias após terem sido formados, e eles são descartados continuamente em pequenos flocos de pele morta (veja, por exemplo, a Figura 2.6A).

Assim, as células amplificadoras transitórias estão sujeitas a um maior risco de sofrerem mutações, devido a sua alta atividade mitótica, e sua progênie diferenciada pode estar localizada em um ambiente mutagênico. No entanto, qualquer dano genético que as células amplificadoras transitórias e sua progênie diferenciada venham a sofrer terá poucas consequências para o tecido como um todo: cedo ou tarde essas células serão retiradas do tecido, e, uma vez mortas, as mutações acumuladas por elas também desaparecem.

A dinâmica das células-tronco e sua progênie pode ser demonstrada mais graficamente pelas células-tronco e pelos *enterócitos* (células epiteliais diferenciadas) do intestino e do cólon. Estas células, e seu comportamento, foram descritos anteriormente no contexto das discussões sobre o gene supressor de tumor *Apc* e sobre a β -catenina (Seção 7.11). Agora, retornaremos a eles novamente para ilustrar outros princípios. Lembre-se de que as células-tronco estão profundamente embebidas em criptas (Figura 12.2A). Lá, elas estão fora de perigo, estando protegidas do conteúdo mutagênico do lúmen por uma grossa camada de muco secretada pelas células das criptas. Esse muco, que é formado por proteínas altamente glicosiladas chamadas mucinas, cria uma barreira semelhante a uma geléia, que previne o conteúdo do lúmen intestinal de penetrar na cripta (veja a Figura 12.2B) e ilustra ainda outra estratégia pela qual as mutações podem ser minimizadas nos genomas de células-tronco: a evolução criou mecanismos pelos quais as células-tronco são anatomicamente protegidas da ação de toxinas, incluindo carcinógenos. (Então, camundongos geneticamente modificados que não possuem o gene que codifica *Muc2*, a mucina gastrintestinal mais abundante, tendem a desenvolver adenomas no intestino, muitos dos quais progridem para adenocarcinomas.) Isso confere ainda mais proteção aos genomas das células-tronco, complementando o mecanismo mencionado anteriormente, no qual as células descendentes dessas células, que podem ter sofrido mutações, são removidas para fora das criptas e eliminadas após um período de 5 a 7 dias (Figura 12.2C).

Em teoria, o compartimento de células-tronco de um tecido possui uma capacidade interminável de gerar uma progênie diferenciada sem nunca ser depletada. No entanto, quase inevitavelmente, uma célula-tronco será perdida desse compartimento por um ou outro acidente. Essa perda na população deve ser preenchida por outras células-tronco. Mais especificamente, ambas as filhas de uma célula-tronco sobrevivente serão necessárias para reter o fenótipo materno, que dessa forma sofre uma divisão assimétrica (Figura 12.3). Isso também pode ter implicações para a manutenção do genoma, como veremos a seguir.

12.2 Células-tronco são os alvos prováveis da mutagênese que leva ao câncer

As propriedades das células intestinais (veja a Figura 12.2) também nos fornecem pistas importantes sobre a identidade das células que são os principais alvos da carcinogênese. Tendo excluído as células mais diferenciadas (já que elas são rapidamente descartadas), devemos mudar nosso foco para as células de vida longa e para linhagens celulares de tecidos epiteliais. Na verdade, já havíamos nos deparado com evidências que apontam para o papel central das células de vida longa ao processo da carcinogênese. Na seção 11.3, lemos sobre protocolos experimentais utilizados para induzir a formação de câncer de pele em camundongos.

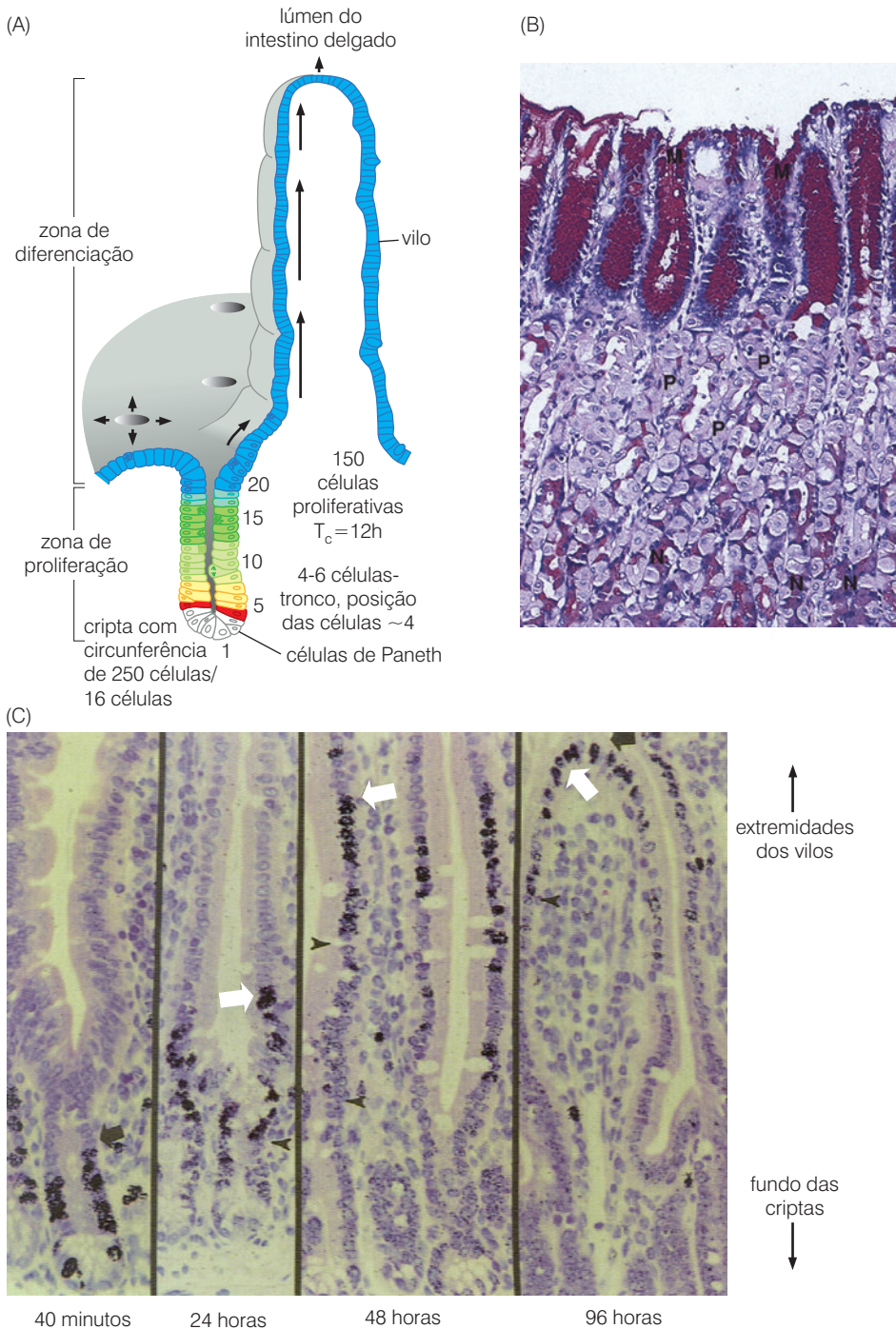


Figura 12.2 Células-tronco e a organização das criptas gastrintestinais (A) O esquema da organização de tecidos demonstrado na Figura 12.1 é bem-ilustrado pela organização das células epiteliais – enterócitos – no intestino delgado (veja também a Figura 11.5). As 4 a 6 células-tronco localizadas próximas ao fundo das criptas (vermelho) estão protegidas dos conteúdos do intestino pela sua localização e pelo muco que previne a entrada de fluidos do lúmen intestinal nas criptas (veja o painel B). As células-tronco espalham um grande número (~150) de células amplificadoras transitórias (amarelo, verde), que se dividem a cada 12 horas ou menos. Sua divisão origina aproximadamente 3.500 enterócitos (azul), que cobrem os vilos – as estruturas semelhantes a dedos que se projetam para o intestino delgado. Os enterócitos estão continuamente migrando para a ponta dos vilos, onde sofrem apoptose e são liberados para o lúmen do intestino delgado. Os números à direita da cripta indicam a posição das células a partir do fundo da cripta. (B) Grandes quantidades de muco protetor (roxo-escuro) são secretadas pelas células que circundam poços comparáveis nas paredes do estômago, compostas por proteínas altamente glicosiladas chamadas mucinas, como também pode ser encontrado nas criptas do intestino delgado e intestino grosso. (C) A emigração de células amplificadoras transitórias das criptas do intestino delgado pode ser rastreada com a injeção de uma dose de ^3H -timidina (isto é, timidina radiativa carregando um átomo de trítio) em um camundongo e seguindo a incorporação do material marcado pelo DNA por *auto-radiografia*; o decaimento radiativo é indicado por grânulos cinza-escuro. (A incorporação ocorre apenas por um breve período.) Podem ser vistas aqui as células nas criptas do duodeno do camundongo nos tempos indicados após a injeção de ^3H -timidina. Células que se multiplicaram apenas um pequeno número de vezes após a incorporação inicial de ^3H -timidina permanecem fortemente marcadas (setas grossas), ao passo que a grande maioria das células sofreu múltiplas divisões adicionais após a marcação (durante o período de procura) e, portanto, exibem uma marcação radiativa diluída. Após quatro dias, virtualmente todos os genomas que foram sintetizados no início do experimento já foram carregados para fora das criptas e para as extremidades dos vilos. (A, cortesia de C. S. Potten; B, de B. Young e J.W. Heath et al., *Wheater's functional histology*, 4th ed. Edinburgh: Churchill Livingstone 2003; C, de C.S. Potten, *Phil. Trans. Royal Soc. London B* 353:830, 1998.)

Um desses protocolos envolveu pincelar um pequeno pedaço de pele com um agente iniciador, e, após isso, deixar essa amostra intocada por alguns meses, ao final dos quais ela foi pincelada repetidamente com TPA, um potente promotor de tumor na pele. As células que haviam sido expostas ao carcinógeno iniciador “lembraram-se” dessa exposição um ano depois, sofrendo proliferação e formando um papiloma de pele na presença do promotor. Na pele, como em muitos outros tecidos epiteliais, as células que vivem mais são aquelas presentes no compartimento das células-tronco.

Provocativamente, o número de papilomas de pele e carcinomas induzidos pelo protocolo de carcinogênese em pele de camundongo (veja a Figura 11.28) não é reduzido se a pele do

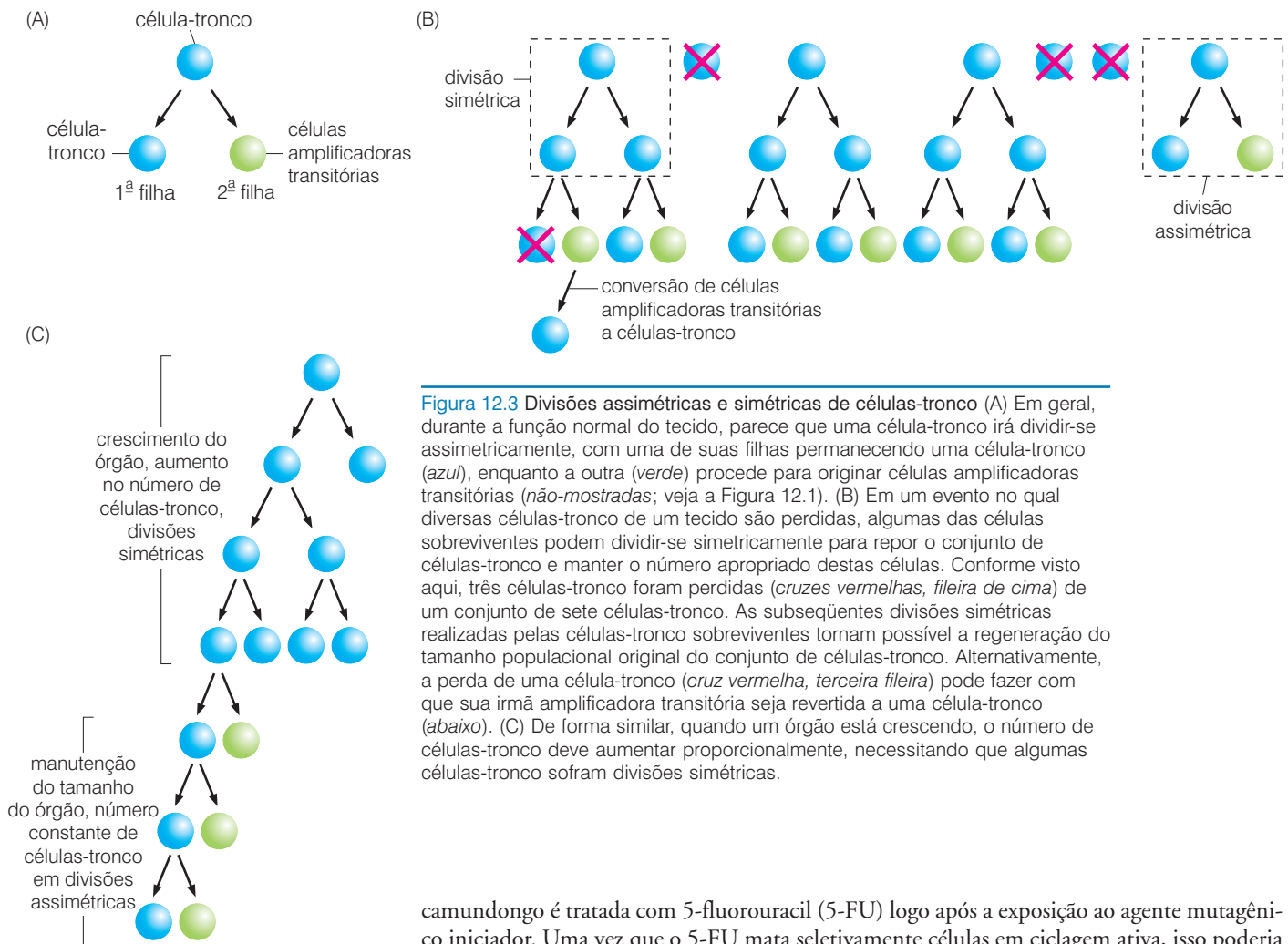


Figura 12.3 Divisões assimétricas e simétricas de células-tronco (A) Em geral, durante a função normal do tecido, parece que uma célula-tronco irá dividir-se assimetricamente, com uma de suas filhas permanecendo uma célula-tronco (azul), enquanto a outra (verde) procede para originar células amplificadoras transitórias (não-mostradas; veja a Figura 12.1). (B) Em um evento no qual diversas células-tronco de um tecido são perdidas, algumas das células sobreviventes podem dividir-se simetricamente para repor o conjunto de células-tronco e manter o número apropriado destas células. Conforme visto aqui, três células-tronco foram perdidas (cruzes vermelhas, fileira de cima) de um conjunto de sete células-tronco. As subseqüentes divisões simétricas realizadas pelas células-tronco sobreviventes tornam possível a regeneração do tamanho populacional original do conjunto de células-tronco. Alternativamente, a perda de uma célula-tronco (cruz vermelha, terceira fileira) pode fazer com que sua irmã amplificadora transitória seja revertida a uma célula-tronco (abaixo). (C) De forma similar, quando um órgão está crescendo, o número de células-tronco deve aumentar proporcionalmente, necessitando que algumas células-tronco sofram divisões simétricas.

camundongo é tratada com 5-fluorouracil (5-FU) logo após a exposição ao agente mutagênico iniciador. Uma vez que o 5-FU mata seletivamente células em ciclagem ativa, isso poderia indicar que as células atingidas pelos mutágenos carcinogênicos durante a iniciação não estão no ciclo celular ativo no momento da iniciação e logo após esta, corroborando a idéia de que o alvo para a iniciação é um tipo celular que se divide apenas ocasionalmente.

Análises de diversos tipos de leucemia sugeriram que os alvos iniciais da carcinogênese no sistema hematopoiético também são células-tronco. O exemplo mais dramático é fornecido pela leucemia mielogenosa crônica, a CML. Conforme descrito anteriormente, o cromossomo Filadélfia (Ph¹), que resulta de uma translocação cromossômica recíproca que fusiona os genes *bcr* e *abl* (veja a Seção 4.6), pode ser observado em quase todos os casos dessa doença. Evidências extensivas sugerem que essa translocação particular é a lesão genética que inicia a doença.

Vários tipos celulares hematopoiéticos distintos de um paciente com CML podem possuir o cromossomo Ph¹. Estão incluídas as células linfóides (tanto B quanto T), bem como as células da linhagem mielóide (incluindo neutrófilos, granulócitos, o megacariócito precursor de plaquetas e os eritrócitos). Tal observação é uma grande evidência de que o tipo celular no qual a translocação ocorreu originalmente é o progenitor comum de todas as linhagens celulares hematopoiéticas – as células-tronco **pluripotentes** que servem como precursoras para muitos tipos celulares (veja a Figura 12.4). Como muitas outras células-tronco, essa célula-tronco hematopoiética (HSC) parece possuir um tempo de vida longo no sistema hematopoiético, mais especificamente, na medula óssea. No caso particular da CML, uma célula-tronco que sofreu uma mutação crítica – a formação do cromossomo Ph¹ – retém a opção de despachar sua progênie como um número de linhagens celulares hematopoiéticas distintas. Outras indicações, ainda, do papel das células-tronco como alvo para a formação de tumores, vêm de outros tipos de alterações hematopoiéticas (Barra lateral 12.1).

Observações bastante convincentes do papel das células-tronco no desenrolar do câncer derivam de camundongos, nos quais a expressão de um oncogene *ras* ativado está limitada às células-tronco de queratinócitos na pele (que, neste caso, estão localizadas nos folículos capilares) ou aos queratinócitos que entraram em um estado diferenciado terminal. Quando o transgene direciona a expressão do oncogene de *ras* nas células-tronco, o camundongo desenvolve carcinomas malignos. Por outro lado, quando o mesmo oncogene é expresso nos queratinócitos em diferenciação, formam-se papilomas benignos, e estes tendem a regredir.

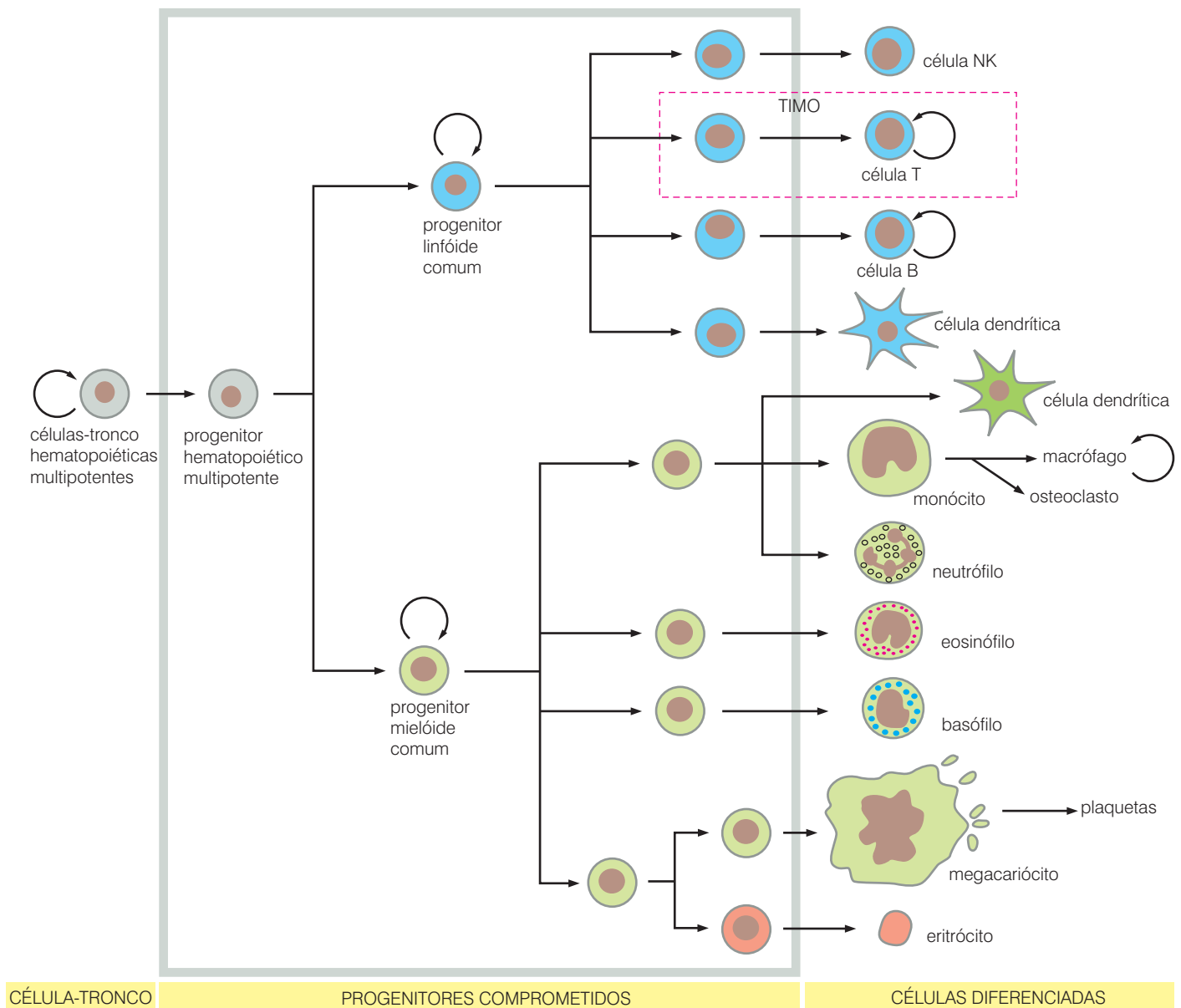


Figura 12.4 Diferenciação hematopoética Nosso entendimento atual da diferenciação de células hematopoéticas nos ensina diversas lições. (1) Ela indica que um único tipo celular – células-tronco hematopoéticas multipotentes (HSC; esquerda) – é capaz de originar virtualmente todos os tipos celulares do sangue e do sistema imune. (2) Mostra que um único tipo celular de célula-tronco pode originar muitos tipos de células-tronco progenitoras comprometidas, neste caso, os dois tipos celulares de células-tronco que são comprometidos na geração de tipos celulares mielóides e linfóides. (3) Mostra que a capacidade auto-renovável (setas curvas) não está confinada a um único tipo de célula-tronco de um

tecido; em vez disso, em alguns tecidos, como o representado aqui, “progenitores comprometidos” (i. e., as células-tronco mielóides e linfóides mostradas aqui) bem como alguns de seus descendentes possuem capacidade de se auto-renovar. O fato de que um paciente sofrendo de CML (leucemia mielógena crônica) frequentemente exibe diversos tipos celulares linfóides e mielóides distintos e diferenciados que carregam o cromossomo Ph¹ (e uma translocação BCR-ABL) é uma forte indicação de que esse cromossomo anormal foi inicialmente formado em alguma HSC multipotente ou por um progenitor. (De Alberts et. al., Molecular Biology of the Cell, 4th ed. New York: Garland Science, 2002.)

Barra lateral 12.1 A diferenciação bloqueada é um tema frequente no desenvolvimento de malignidades hematopoiéticas. Existem dezenas de exemplos de malignidades em animais e em humanos nas quais a inibição da diferenciação favorece o surgimento de neoplasias. Possivelmente a primeira dessas situações a ser definida geneticamente envolveu o vírus da eritroblastose aviária, um retrovírus que codifica duas oncoproteínas: seu gene *erbB* especifica uma versão constitutivamente ativa do receptor do fator de crescimento epidermal (EGF) (veja a Seção 5.4), que direciona a proliferação de eritroblastos (precursores das células vermelhas do sangue), enquanto o oncogene *erbA* codifica um receptor nuclear (um homólogo do receptor do hormônio da tireóide), que inibe a diferenciação dos eritroblastos hiperproliferadores criados por *erbB*. De forma similar, na leucemia mielógena aguda de humanos (AML), uma grande variedade de lesões genéticas encontradas em células leucêmicas foram classificadas em duas classes funcionais: aquelas que são necessárias para provocar a proliferação das células precursoras mielóides e aquelas que são necessárias, nas mesmas células, para bloquear a diferenciação subsequente.

Nas leucemias megacarioblásticas (uma malignidade nas células precursoras de plaquetas), encontradas com alguma frequência em pacientes com Síndrome de Down, o gene que codifica o fator de transcrição GATA1 é encontrado frequentemente em uma forma mutada, prevenindo a maturação apropriada desses precursores de plaquetas. Esses poucos exemplos fornecem uma noção de que a saída das células dos compartimentos de células-tronco deve ser impedida para que a tumorigênese tenha sucesso.

Não direcionadas por tais observações, estão as identidades precisas das células-tronco alvo de transformação. Em muitos casos, o alvo não é uma célula-tronco hematopoiética pluripotente, mas sim um de seus derivativos que já está comprometido com uma ou outra linhagem de diferenciação. Tais “progenitores comprometidos” (veja a Figura 5.4) normalmente podem possuir uma capacidade significativa (porém limitada) de se auto-renovar, e não são ainda completamente diferenciados, podendo ser considerados células-tronco. A sua transformação de células normais para células tumorais envolve, entre outras modificações, a aquisição da capacidade ilimitada de auto-renovação.

Essas várias linhas de evidência, obtidas de diversos tipos de tecidos, convergem para a conclusão de que as células auto-renovadoras de muitos tipos celulares são os alvos para as mudanças genéticas que levam, cedo ou tarde, à formação de tumores. Em alguns casos, as células-alvo podem ser células-tronco com capacidade de auto-renovação ilimitada; em outros, progenitoras comprometidas, que normalmente possuem apenas uma capacidade limitada de se auto-renovar, podem adquirir capacidade de auto-renovação ilimitada durante o curso da tumorigênese. Esta idéia, por sua vez, pode explicar algumas epidemiologias complexas de certos tipos de tumores humanos, como o câncer de mama.

12.3 Apoptose, bombas de drogas e mecanismos de replicação de DNA oferecem aos tecidos uma forma de minimizar o acúmulo de células-tronco mutantes

O papel aparentemente predominante das células-tronco normais como alvos para a transformação indica que os genomas dessas células devem ser protegidos por quaisquer estratégias biológicas e bioquímicas que essas células e os tecidos ao redor possam fornecer. Já discutimos duas dessas estratégias: a replicação, relativamente pouco frequente, do DNA das células-tronco e a localização das células-tronco em um local anatomicamente protegido. Ainda, esses mecanismos não parecem suficientes, de modo que os organismos desenvolveram outras estratégias.

As células-tronco nas criptas do intestino de camundongo (veja a Figura 12.2) e das glândulas mamárias representam objetos especialmente atrativos para o estudo dessas estratégias protetoras. No caso das criptas, a necessidade de mecanismos protetores adicionais é clara: as linhagens de células-tronco de enterócitos, nas criptas do intestino delgado do camundongo, foram estimadas como passando por uma sucessão de mil ciclos de divisão e crescimento durante uma vida, sendo que cada um desses ciclos expõe as células-tronco a diversos tipos de danos genéticos. De forma similar, no intestino humano, o número de divisões celulares ocorrendo a cada ano excede o número total de células residindo no corpo inteiro ao mesmo tempo; essa enorme atividade mitótica, grande parte da qual envolve células amplificadoras transitórias, também deve depender de muitas divisões sucessivas de células-tronco, ainda que no caso dos humanos o número aproximado não seja conhecido.

Um mecanismo protetor é sugerido pela resposta das células-tronco nas criptas a danos genéticos massivos. Nas criptas intestinais do camundongo, as células-tronco que sofreram dano genético infligido por raios X irão rapidamente iniciar apoptose, em vez de conter a proliferação e tentar reparar o dano. A razão disso parece estar associada com a natureza propensa a erros do reparo de DNA. Conforme veremos depois, o aparato de reparo celular é muito eficiente, porém imperfeito, de modo que algum resíduo não-reparado ou incorretamente corrigido é deixado para trás no DNA cromossômico. Se tais lesões forem encontradas pela maquinaria de replicação do DNA, elas podem originar seqüências de DNA mutantes copiadas e passadas adiante para células-filhas, incluindo aquelas que irão tornar-se células-tronco. Assim, para não correr tal risco, as células-tronco nas criptas do camundongo irão iniciar apoptose preferencialmente, como resposta a um dano no DNA. Não está claro se células-tronco de outros tecidos possuem essa tendência a entrar em apoptose.

Além disso, outro mecanismo é sugerido por uma técnica comumente utilizada para separar células-tronco do conjunto de células de um tecido por meio de separador celular ativado por fluorescência (FACS; veja a Figura 11.13). As células-tronco bombeiam para fora, de forma bastante eficiente, algumas moléculas fluorescentes, ao passo que os derivativos diferenciados dessas células o fazem muito menos ativamente. Como consequência, após a exposição de uma população de células a tais moléculas fluorescentes, as células-tronco fluorescem muito mais fracamente do que todas as outras células da população.

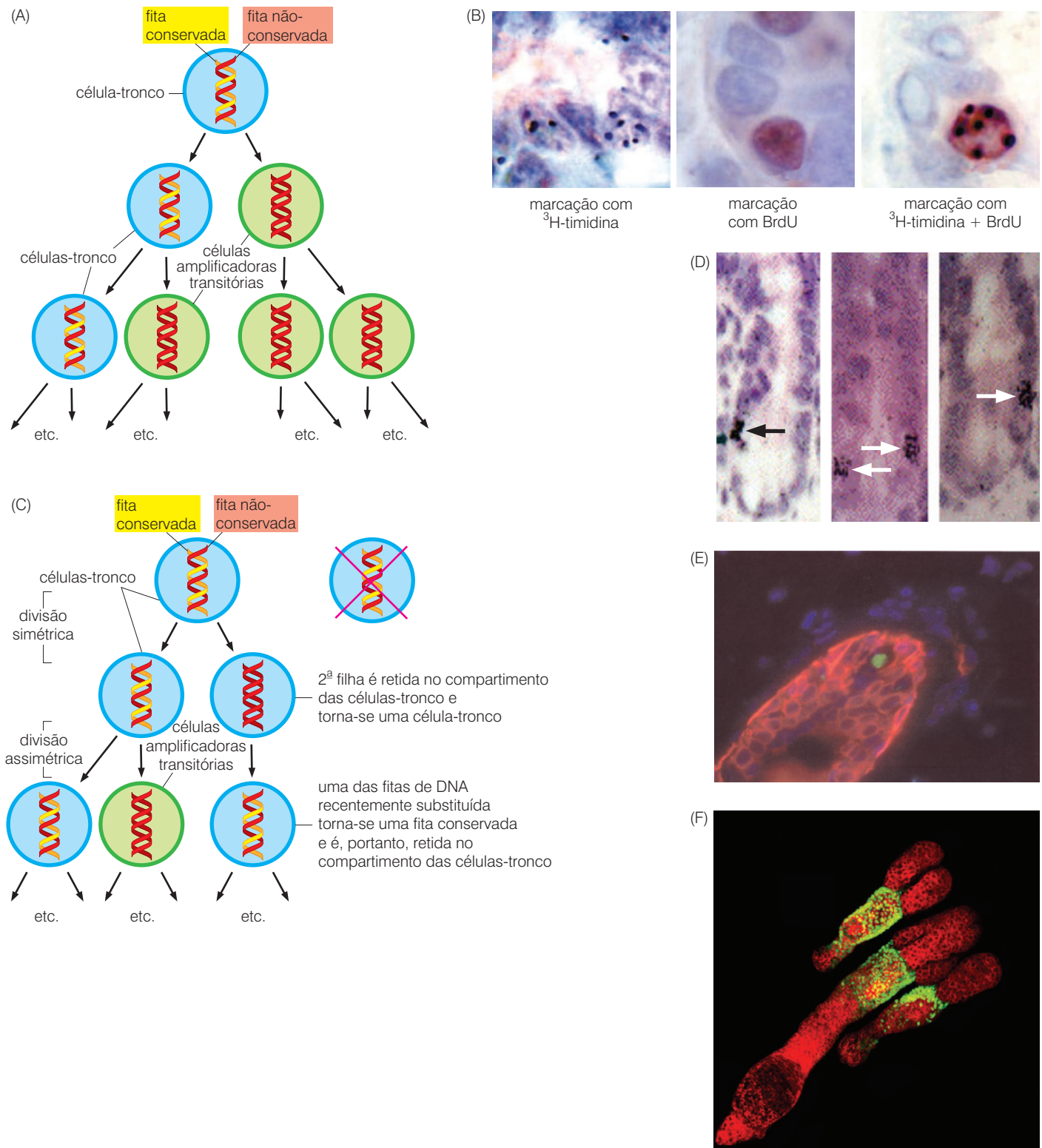
A excreção ativa dessas moléculas fluorescentes deve-se à ação de uma proteína da membrana plasmática chamada Mdr1, que foi descoberta devido ao fato de que muitas células cancerígenas a exploram para bombear para fora e, assim, adquirir resistência a moléculas de drogas quimioterapêuticas. Os níveis muito elevados, e não usuais, da expressão de Mdr1 por muitas células-tronco parece representar uma estratégia utilizada para proteger seus genomas de compostos potencialmente mutagênicos, oriundos do meio externo, que poderiam vir a entrar em seu citoplasma.

O mecanismo de alocação assimétrica da fita de DNA também parece possuir papel importante na prevenção do acúmulo de danos genéticos por células-tronco de certos tecidos. As observações experimentais que suportam esse mecanismo proposto ainda são fragmentadas. Ainda assim, encontra-se presente aqui, devido ao seu interesse e importância em potencial para o entendimento da patogênese do câncer.

A razão por trás dessa estratégia, primeiramente proposta em 1975, deriva dos detalhes moleculares da replicação do DNA ocorrendo nas células-tronco. Recentemente revisamos o modelo da divisão celular das células-tronco, no qual a divisão é normalmente assimétrica, pois uma célula-filha permanece uma célula-tronco e a outras entram em uma via de diferenciação para produzir células amplificadoras transitórias (veja a Figura 12.1). Idealmente, ao genoma doado para a célula-filha que permanece uma célula-tronco deve ser conferida *maior proteção* do que ao genoma que é passado para a célula-filha destinada a diferenciar-se, já que os descendentes desta última serão descartados cedo ou tarde. Conforme ilustrado na Figura 12.5A, a alocação assimétrica das fitas de DNA pode ajudar a atingir esse objetivo.

A idéia aqui está baseada, mais uma vez, no fato de que a replicação do DNA é inerentemente falível. De acordo com algumas estimativas, cada vez que uma célula passa pela fase S e replica seu DNA, diversas substituições nucleotídicas ocorrem por genoma celular, pois a DNA polimerase comete erros que escapam da detecção e reparo subsequentes. (Na verdade, esse número pode subestimar os erros na replicação do DNA.) Consequentemente, as fitas de DNA que não foram sintetizadas durante ciclo de replicação recente – as fitas “conservadas” – têm maior probabilidade de possuírem as seqüências do tipo selvagem do que aquelas fitas “não-conservadas”, que são, de fato, os produtos da síntese de DNA.

Isso sugere que em um tecido bem-desenhado, as fitas de DNA que não foram originadas pela replicação recente do DNA devem ser mantidas para a célula-filha que permanecerá no compartimento de células-tronco, ao passo que as fitas de DNA que foram produzidas pela replicação de DNA devem ser alocadas para as células-filhas cujos descendentes estão desti-



nados à diferenciação e, finalmente, morte. Conforme a Figura 12.5A torna claro, uma fita de DNA (a fita conservada, ou “imortal”) pode, a princípio, ser transmitida indefinidamente através de uma linhagem de células-tronco por meio dessa segregação assimétrica das moléculas de DNA. Dito de forma diferente, as células-tronco podem carregar fitas de DNA que repetidamente serviram como *moldes* para a replicação do DNA, mas apenas muito pouco

Figura 12.5 Fitas conservadas de DNA e o genoma das células-tronco (A) O modelo da “fita imortal” mostra uma fita conservada de DNA (*amarelo*) do DNA cromossomal de uma célula-tronco (*azul-claro*) que é doada para sua célula-filha que permanecerá uma célula-tronco e é, portanto, retida no compartimento das células-tronco; essa fita de DNA conservada não é o produto da replicação recente do DNA. Em vez disso, a fita “não-conservada” (*vermelho*), que é, de fato, o produto da replicação recente de DNA, será alocada preferencialmente para a célula-filha que originará células amplificadoras transitórias (*verde-claro*), deixando o compartimento das células-tronco; a nova rodada de replicação de DNA adiciona uma nova fita à fita parental não-conservada (*vermelha*). Esse modelo prevê que uma fita de DNA pode persistir indefinidamente dentro do compartimento das células-tronco sem sofrer replicação. (B) Esta predição é satisfeita na glândula mamária de camundongo. Os camundongos podem ser expostos a um pulso breve de ^3H -timidina em algum período durante a puberdade, no qual a glândula ainda está crescendo e o número de células-tronco epiteliais mamárias está aumentando constantemente, necessitando de divisões simétricas, nas quais ambas as filhas de uma célula-tronco tornam-se células-tronco (veja a Figura 12.3C) e, portanto, hipoteticamente, ambas as fitas de DNA são retidas como fitas de DNA conservadas. Assim, a marcação incorporada durante esse período pode ser retida indefinidamente nas fitas do DNA conservado. O DNA que incorporou ^3H -timidina é detectado incubando fatias de tecido em uma emulsão fotográfica (*grânulos escuros*) – o procedimento da *auto-radiografia*. Cinco semanas após a exposição inicial a ^3H -timidina, a marcação radiativa encontra-se retida em apenas aproximadamente 2% das células epiteliais mamárias (*esquerda*). Nesse momento, os camundongos podem ser expostos a um pulso de bromodeoxiuridina (BrdU), um análogo de timidina cuja incorporação ao DNA pode ser detectada por um anticorpo específico que reconhece o DNA contendo BrdU (*núcleos pintados de vermelho, centro*). Seguindo esse pulso, BrdU pode ser detectado na maioria das células que retiveram a marcação vinda de ^3H -timidina cinco semanas antes (*painel à direita*). Assim, essas células que retiveram a marcação estão proliferando ativamente cinco semanas depois e ainda assim retêm uma fita conservada que foi sintetizada cinco semanas antes e que não é perdida pelos ciclos de crescimento e divisão que as células estão sofrendo. (C) Quando uma célula-tronco é perdida (*direita, acima*) em um indivíduo adulto (no qual o tamanho da população de células-tronco deve ser constante), uma célula-tronco sobrevivente irá se dividir simetricamente, para que ambas as células-filhas permaneçam células-tronco, reconstituindo, dessa forma, a população original de células-tronco (veja a Figura 12.3B). Nessa célula-filha (*direita*), uma fita de DNA que era inicialmente “não-conservada”, ou seja, produto de uma replicação recente (*vermelho*), será retida no compartimento das células-tronco e se tornará uma fita de DNA conservada ou imortal (*amarelo*). Dessa forma, matando-se células-tronco de um adulto pode ser possível marcar o DNA de células-tronco de uma forma que essa marcação seja retida indefinidamente no compartimento de células-tronco. (D) Essa predição é satisfeita pelo comportamento das células-tronco do duodeno de camundongo. Nas criptas, os enterócitos são normalmente fornecidos pela multiplicação contínua das células-tronco localizadas próximo ao fundo das criptas (veja a Figura 12.2A). Como no painel (B), as moléculas de DNA de células em proliferação podem ser marcadas por meio de uma breve exposição a ^3H -timidina e detectadas subsequentemente por auto-radiografia. Normalmente, todo o DNA marcado que é inicialmente sintetizado migra para fora das criptas juntamente com as células amplificadoras transitórias e a sua progênie de enterócitos, sendo indetectáveis nas criptas após alguns dias (veja a Figura 12.2C). No entanto, se o duodeno é exposto a 8 grays (Gy) de irradiação X (que mata algumas das células-tronco) antes da marcação radiativa, as células nas criptas retêm a marcação até oito dias após um pulso breve de timidina radiativa. Quatro exemplos dessas células que retiveram a marcação (LRCs), encontradas na localização precisa das células-tronco nas criptas, são mostrados aqui (*flechas*). (E) Neste ducto mamário, as células epiteliais mamárias (MECs) estão coradas para a expressão de citoqueratina (*vermelho*). Uma LRC que incorporou BrdU nove semanas antes está imunocorada em *verde*. (F) LRCs podem ser encontradas na região “protuberante” dos folículos capilares de camundongo, em que as células-tronco de queratinócitos residem. Essas células, que foram induzidas a expressar uma forma estável da proteína verde fluorescente (GFP) quando tinham quatro semanas de idade, continuam a expressar GFP quatro semanas após esse evento. As células epiteliais estão coradas em *vermelho*. (B, de G.H. Smith, *Development* 132:681-687, 2005; D, cortesia de C.S. Potten; E, cortesia de B. Welm e M.A. Goodell; F, cortesia de T. Tumber, V. Greco, e E. Fuchs.)

freqüentemente sintetizadas como *produtos* para a replicação do DNA (pelo menos desde que o tecido adulto se formou). Enquanto a Figura 12.5A ilustra o comportamento de uma pequena porção de DNA, podemos imaginar que todo o DNA cromossomal das células-tronco se comporta dessa forma também.

Esse modelo de alocação assimétrica das fitas (também chamado modelo da “fita conservada”) pode ser testado experimentalmente. De fato, já vimos uma manifestação desse comportamento no experimento ilustrado na Figura 12.2C. Naquele caso, as células-tronco incorpo-

ravam ^3H -timidina por um curto período. O precursor radiativo tornava-se incorporado nas fitas de DNA que estavam sendo replicadas durante esse curto período, após o qual a incorporação cessava (tal protocolo experimental é freqüentemente chamado de marcação *pulse-chase*). O destino das moléculas de DNA marcadas era observado por meio da técnica de **auto-radiografia**, na qual uma emulsão fotográfica é posicionada em uma fatia de tecido; essa emulsão origina uma marca preta facilmente visualizada sempre que um átomo radiativo como o **trítio** decai. Se a alocação das fitas de DNA fosse simétrica, esperaríamos que uma porção da marcação permanecesse no compartimento das células-tronco e que outra porção fosse distribuída para as células em diferenciação que já haviam abandonado esse compartimento.

Conforme a Figura 12.2C demonstrou, virtualmente todas as fitas de DNA marcadas migraram para fora do compartimento de células-tronco junto com as células amplificadoras transitórias que iniciaram sua diferenciação. Isso suporta a idéia de que as fitas recentemente sintetizadas (i. e., aquelas que foram sintetizadas durante o pulso de ^3H -timidina) eram dadas preferencialmente para as células-filhas que geravam células amplificadoras transitórias e os seus descendentes mais diferenciados que migraram para fora das criptas. Por outro lado, descobrimos que é extremamente difícil marcar as fitas de DNA que permanecem retidas no compartimento das células-tronco dentro das criptas.

Na verdade, existe uma explicação alternativa para esta observação: a marcação radiativa deixa o compartimento das células-tronco rapidamente porque ela é rapidamente diluída pelos ciclos repetidos de crescimento e divisão no compartimento das células-tronco. Tal fato pode ser testado criticamente pela exposição de células-tronco à ^3H -timidina em uma ocasião na qual o compartimento estivesse em expansão; nessas condições, as células-tronco deveriam sofrer divisões simétricas para aumentar seu número (veja a Figura 12.3C), de modo que *ambas* as fitas de DNA marcadas deveriam ser retidas no compartimento das células-tronco. Isso é exatamente o que é visto quando às células-tronco epiteliais mamárias de camundongo é permitido incorporar ^3H -timidina durante a puberdade, quando a glândula mamária está crescendo rapidamente (veja a Figura 12.5B). Nessas condições, a marcação radiativa mantém-se muitas semanas após esse evento no compartimento das células-tronco, apesar de as células “retentoras de marcação” (LRCs) estarem dividindo-se ativamente durante esse tempo. (A fita marcada herdada de seus ancestrais muitas gerações antes retém sua marcação apesar de repetidos ciclos de divisão e crescimento.)

Outro teste do modelo da fita conservada vem de experimentos em algumas das células-tronco mortas pela exposição a raios X. As células remanescentes no compartimento de células-tronco irão tentar repor as células-tronco perdidas por meio de divisões celulares simétricas, nas quais ambas as células-filhas permanecerão como células-tronco (veja a Figura 12.3B). Como consequência, uma fita de DNA recém-sintetizada, que normalmente seria alocada para a célula-filha em diferenciação, será agora convertida em uma fita conservada e retida no compartimento das células-tronco (Figura 12.5C).

Se expusermos o compartimento de células-tronco das criptas intestinais de camundongo às ^3H -timidina durante o período no qual células-tronco perdidas estão sendo substituídas, poderemos marcar moléculas de DNA que permanecerão subsequentemente no compartimento das células-tronco por um período indeterminado; ou seja, as moléculas marcadas não são “apagadas” quando as células-tronco são expostas subsequentemente a precursores não-marcados de timidina (Figura 12.5D). Assim, o único momento da vida de um animal adulto no qual podemos introduzir uma marcação radiativa duradoura em seu compartimento de células-tronco parece ser quando perturbamos esse compartimento, matando algumas de suas células. Nessas condições, tanto a fita de DNA imortal quanto a fita recém-sintetizada, não-imortal, são retidas nas células que se tornam estavelmente protegidas nas criptas do intestino delgado.

Células que retêm a marcação também são encontradas em outros tecidos epiteliais (Figura 12.5E e F). Apesar desta e de outras evidências, muitas das quais obtidas do camundongo, o modelo da “fita imortal” permanece matéria de especulação para a maioria dos tecidos e

Barra lateral 12.2 Alguns carcinógenos podem produzir células mutantes por sua habilidade de serem citotóxicos O modelo da fita “imortal” faz predições acerca de como os carcinógenos funcionam. Podemos imaginar, por exemplo, que alguns carcinógenos, em vez de serem diretamente mutagênicos, agem por meio de sua capacidade de serem citotóxicos e, assim, de matarem as células de um tecido, incluindo algumas de suas células-tronco. Quando tal carcinógeno mata uma célula-tronco recém-formada por mitose, a irmã dessa célula-tronco, formada pela mesma mitose, pode ficar retida no compartimento de células-tronco em vez de ser despachada para o conjunto de células em dife-

renciação, como normalmente seria seu destino (veja a Figura 12.3B). No entanto, essa célula-irmã pode acabar carregando uma sequência mutante de DNA devido a um erro na replicação do DNA que ocorreu na fase S mais recente. Uma vez que essa célula-irmã é recrutada no compartimento de células-tronco, a fita de DNA contendo essa sequência mutante pode então ser escolhida para se tornar uma fita de DNA “imortal”, garantindo, assim, que essa mutação esteja agora permanentemente estabelecida no compartimento de células-tronco.

Encontramos carcinógenos não-geotóxicos anteriormente, durante a discussão sobre promotores de tumor (Seção 11.14). Lá, defendemos que

alguns promotores de tumor, como o etanol, agem por meio de sua capacidade de causar morte celular em um tecido-alvo, resultando em uma proliferação compensatória das células sobreviventes desse tecido. Agora, como vimos estes promotores de tumor no contexto da biologia das células-tronco, podemos especular que muitos promotores de tumor podem agir por meio de sua capacidade de matar células-tronco. Um agente ainda mais perigoso seria um carcinógeno “completo” (Seção 11.17) – aquele capaz de agir tanto como um iniciador, com suas ações mutagênicas no genoma de células tronco, quanto como um promotor, com seus efeitos citotóxicos nas células-tronco.

necessita de maior validação experimental antes que possamos aceitá-lo como um fato bem-estabelecido. A teoria da fita imortal, se validada, também oferece importantes implicações para o processo de carcinogênese (Barra lateral 12.2).

12.4 Os genomas das células são ameaçados por erros cometidos durante a replicação do DNA

O desenho do compartimento das células-tronco e o comportamento individual das células-tronco ilustram diversas estratégias biológicas empregadas pelos tecidos para reduzir o conteúdo de mutações somáticas acumuladas. Esses mecanismos servem para proteger os genomas das células-tronco, que constituem, na verdade, as “linhagens germinativas dos tecidos. É importante lembrar que essas estratégias representam apenas a primeira linha de defesa contra o dano genômico. A próxima linha de defesa é bioquímica e depende da capacidade de várias proteínas reconhecerem e repararem as moléculas de DNA danificadas dentro das células.

De fato, as moléculas de DNA estão sob ataque constante por uma vasta gama de agentes e processos. Para mantermos a simplicidade, posicionaremos esses processos mutagênicos em três categorias. Primeiro, conforme mencionado anteriormente, a replicação de sequências de DNA pelas DNA polimerases durante a fase S do ciclo celular está sujeita a um nível baixo, porém não insignificante, de erro. Dentre tais erros estão aqueles gerados quando precursores de nucleotídeos quimicamente alterados são incorporados inadvertidamente ao DNA, no lugar dos componentes usuais. Segundo, mesmo na ausência de ataque por agentes mutagênicos, os nucleotídeos das moléculas de DNA sofrem modificações químicas espontaneamente; essas mudanças com frequência alteram a sequência de bases e, portanto, o conteúdo informativo do DNA. Finalmente, moléculas de DNA podem ser atacadas por diversos agentes mutagênicos, incluindo as moléculas geradas de forma endógena pelo metabolismo celular normal, bem como agentes de origem exógena – espécies químicas e mutágenos físicos (raios X e raios UV) que são introduzidos no corpo a partir do meio exterior. Iremos retornar, nas próximas seções, aos dois últimos processos.

A maquinaria molecular que é responsável por replicar quase todas as sequências de DNA cromossomal possui uma taxa de erro extraordinariamente baixa. A maquinaria básica de replicação no núcleo da célula é alimentada pelas três polimerases, pol- α , pol- δ e pol- ϵ . (De todas, 15 genes distintos para DNA polimerases já foram catalogados no genoma humano, e mais são passíveis de serem descobertos; como ficará claro posteriormente, muitos desses não estão envolvidos na replicação do DNA em si, mas no reparo de moléculas danificadas de DNA.)

Uma célula possui duas estratégias principais para detectar e remover os nucleotídeos mal copiados que surgirem durante a replicação do DNA. A primeira estratégia está nas mãos das próprias DNA polimerases, que são agregados estruturalmente complexos montados a partir de um grande número de subunidades protéicas distintas. Enquanto elas estão avançando no molde de DNA de fita simples e estendendo fitas nascentes de DNA na direção 5' para 3', as DNA polimerases como a pol- δ olham constantemente para trás, “por sobre seus ombros”, escaneando a porção de DNA que elas recentemente polimerizaram; tal monitoramento é freqüentemente chamado de **verificação**. Caso uma polimerase detecte um erro de cópia, ela irá utilizar sua atividade de exonuclease 3' para 5' para se mover para trás e digerir o segmento de DNA que recém foi sintetizado, para então copiar novamente este segmento, na esperança de um melhor desfecho nessa segunda vez (Figura 12.6).

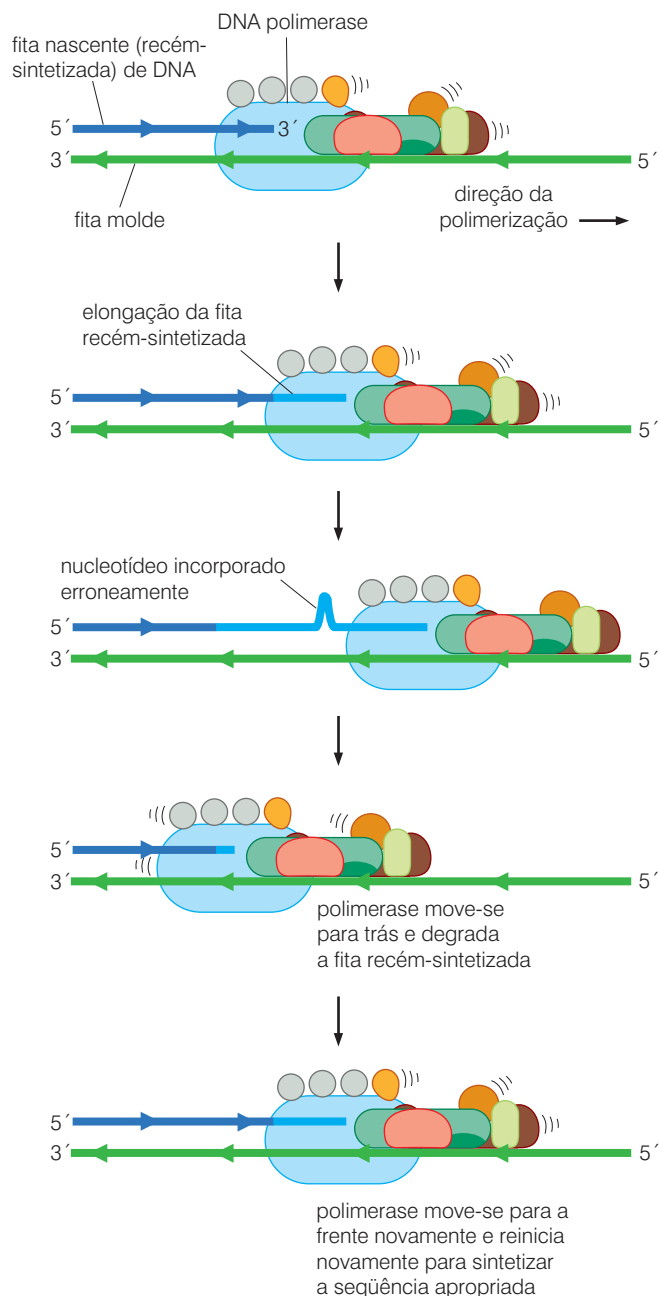
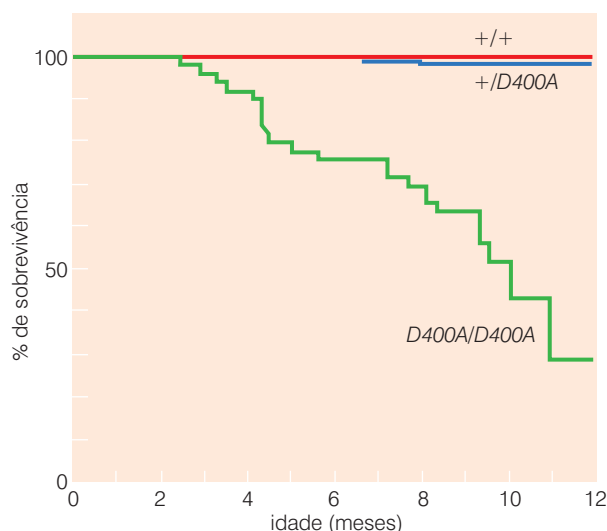


Figura 12.6 Verificação pelas DNA polimerases Muitas DNA polimerases possuem a capacidade de correção que permite com que elas minimizem o número de bases incorporadas erroneamente e retidas na fita recém-sintetizada. Então, quando a DNA polimerase estende uma fita nascente (azul-escuro) na direção 5'-para-3' (movendo-se para frente, para a direita na figura), ela irá utilizar a extremidade 3'-OH da fita nascente como início do alongamento posterior (azul-claro). No entanto, se uma base for incorporada erroneamente (terceiro desenho), a DNA polimerase, que está continuamente olhando para trás para verificar se incorporou as bases corretas na fita de DNA nascente, pode degradar a fita recentemente sintetizada na direção 3'-para-5' (movendo-se para trás, para a esquerda na figura; quarto desenho) e retomar para sintetizar novamente esse pedaço de fita de DNA (desenho mais abaixo).



A importância desse mecanismo de correção para a prevenção do câncer foi ilustrada pela criação de uma cepa de camundongo cujo gene que codifica a pol- δ da linhagem germinativa foi sutilmente alterado (por uma única substituição de aminoácido). A pol- δ mutante resultante retém sua capacidade polimerizante, porém, esta perdeu a sua atividade de exonuclease 3'-para-5'; tal perda elimina sua função de verificação. Em um conjunto de 49 camundongos possuidores do alelo mutante da pol- δ em uma configuração homozigota, 23 desenvolveram tumores em um ano de vida, enquanto nenhum tumor se desenvolveu em um grupo que possuía duas vezes mais camundongos heterozigotos (Figura 12.7). Esse experimento forneceu uma demonstração importante de que a manutenção de seqüências genômicas do tipo selvagem – nesse caso, de uma DNA polimerase – representa uma defesa crítica contra o surgimento do câncer. Além disso, essa observação representa a primeira de muitas indicações de que mutações que levam ao câncer podem ter surgido por meio de processos endógenos, em vez de serem desencadeadas exclusivamente por agentes carcinogênicos externos.

Seguindo de perto as DNA polimerases e suas atividades de verificação, está um grupo complexo de proteínas de **reparo de pareamento errôneo** (MMR). Essas enzimas monitoram o DNA recentemente sintetizado para detectar seqüências de DNA erroneamente copiadas que podem ter sido ignoradas pelo mecanismo de verificação das DNA polimerases.

As ações do sistema de reparo de pareamento errôneo tornam-se especialmente críticas em regiões do DNA que carregam seqüências repetidas. Esses blocos de seqüências incluem simples repetições de mononucleotídeos (como AAAAAA), repetições de dinucleotídeos (como AGAGAGAG) e repetições de seqüências de maior complexidade. Devido a uma falha de alinhamento das fitas parental e nascente, pois as fitas deslizam uma sobre outra e podem sair do alinhamento apropriado, as DNA polimerases parecem ocasionalmente “gaguejar” enquanto copiam essas repetições, resultando na incorporação de número de cópias maior ou menor da seqüência repetida nas fitas filhas recém-formadas (Figura 12.8). Então, a seqüência AAAAAA, ou seja, A₇, pode fazer com que a polimerase sintetize uma seqüência T₆ ou T₈ na fita complementar. As inserções ou deleções resultantes podem ludibriar a detecção pelos componentes de verificação das DNA polimerases e são, portanto, alvos importantes para o reconhecimento e reparo pela maquinaria de reparo de pareamento errôneo.

Por razões históricas, seqüências muito repetidas no genoma, freqüentemente carregando cem nucleotídeos ou mais por cada unidade de repetição, têm sido chamadas seqüências “satélite”. Já que muitas das seqüências menores e mais simples discutidas aqui também podem ser encontradas em diversos locais do genoma, elas foram denominadas **microssatélites**. Um sistema de reparo

Figura 12.7 Verificação pela DNA polimerase e incidência de câncer Uma mutação pontual foi introduzida na cópia no gene que codifica a DNA polimerase- δ da linhagem germinativa de camundongo, a DNA polimerase de mamíferos que é responsável pela maior parte da síntese de ambas as fitas de DNA. Essa mutação, denominada *D400A*, altera a seqüência de aminoácidos no domínio responsável pela verificação na polimerase, especificamente substituindo um ácido aspártico por uma alanina na posição 400 da molécula de polimerase. Mostrados aqui, o destino de 53 camundongos tipo selvagem (+/+), 97 heterozigotos (+/*D400A*) e 49 mutantes homozigotos (*D400A/D400A*). As mortes dos homozigotos mutantes foram todas devidas a malignidades; estas incluíram linfomas, carcinoma de pele escamosa e diversos outros tipos de câncer que ocorreram relativamente de forma pouco freqüente. Dois dos heterozigotos morreram de causas não-relacionadas ao câncer, ao passo que os homozigotos do tipo selvagem sobreviveram até a idade de um ano. As curvas de sobrevivência estão mostradas aqui, em um gráfico de Kaplan-Meier. (De R. E. Goldsby, N. A. Lawrence, L. E. Hays et al., *Nat. Med.* 7:638-639, 2001.)

de pareamento errôneo defeituoso que falha em detectar e remover falhas cometidas pela DNA polimerase, como a apresentada anteriormente, ao copiar um microsatélite resultará na expansão ou encolhimento das seqüências nas células da progênie. Isso cria a condição genética conhecida como *instabilidade dos microsatélites* (MIN; Figura 12.9), que pode, por fim, envolver modificações em milhares de seqüências microsatélite espalhadas no genoma de uma célula.

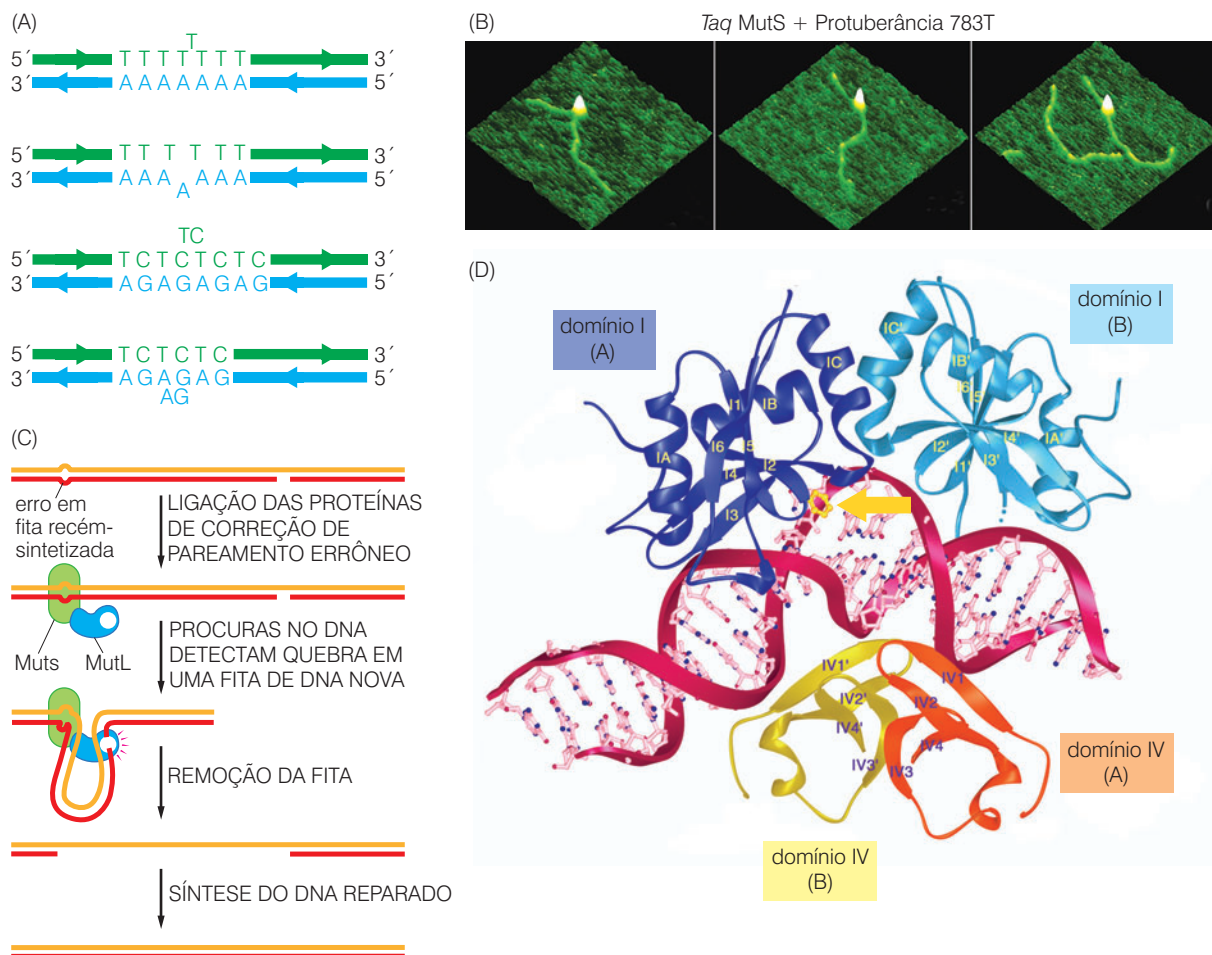


Figura 12.8 Erros da DNA polimerase e reparo de pareamento errôneo (A) As DNA polimerases, notavelmente a pol- δ , ocasionalmente "gaguejam" ou pulam uma base de uma seqüência repetida de DNA (i. e., uma seqüência microsatélite) presente na fita molde (azul) indicada aqui. Como consequência, a fita recém-sintetizada (verde) pode adquirir uma base extra que aumenta o tamanho da seqüência repetida ou pode ficar sem uma base (duas imagens superiores). Uma dinâmica idêntica pode causar mudanças similares nas seqüências microsatélites em que a unidade de repetição é um segmento dinucleotídeo TC (duas imagens inferiores) ou uma seqüência de repetição mais complexa (não-mostrada). (B) Proteínas de reparo de pareamento errôneo (MMR) atuam reconhecendo e reparando os erros cometidos pelas DNA polimerases, incluindo bases erroneamente incorporadas e a replicação incorreta de seqüências microsatélites. Uma poderosa técnica para visualizar as funções individuais de proteínas MMR utiliza microscopia de força atômica. Aqui, a proteína MMR MutS da bactéria *Thermus aquaticus*, uma homóloga de diversas proteínas MMR de mamíferos, foi visualizada ligando-se a um fragmento de DNA no qual um erro de pareamento havia sido introduzido em um nucleotídeo específico. MutS curva a dupla hélice de DNA enquanto escaneia e finalmente encontra regiões de erro de pareamento, às quais ela se liga de forma estável (vista aqui como uma pirâmide branca) (C) Em células eucarióticas, dois componentes do aparato de MMR, MutS e MutL, colaboram para remover o DNA mal

pareado. Conforme ilustrado no painel B, MutS (verde) percorre o DNA procurando erros de pareamento. MutL, então, percorre o DNA procurando quebras de fitas simples de DNA, que identificam a fita (vermelha) que foi sintetizada recentemente; a submetilação da fita recém-sintetizada também pode auxiliar nessa identificação. Após, MutL desencadeia a degradação dessa fita até o ponto em que foi detectado o pareamento errôneo, permitindo que a síntese de DNA reparado siga e gere uma fita de DNA adequadamente pareada. Não está claro se MutL também utiliza outras pistas para determinar a fita de DNA recém-sintetizada. (D) A função da proteína MMR MutS de *Thermus aquaticus* é revelada em maior detalhe ainda por cristalografia de raios X. Parte da estrutura da proteína MutS homodimérica de *T. aquaticus* em complexo com uma hélice mal pareada (vermelha) é mostrada aqui. Os domínios I e IV da subunidade A estão em azul-escuro e laranja, enquanto os domínios correspondentes da subunidade B estão em azul-claro e amarelo. Uma flecha (amarelo) indica onde o resíduo de fenilalanina 39 da subunidade I está associado a uma timidina não-pareada em uma das duas fitas. Defeitos no homólogo humano dessa proteína desempenham um papel crítico em desencadear o câncer hereditário de cólon sem polipose (HNPCC), discutido na Seção 12.9. (B, de H. Wang, Y. Yang, M. J. Schofield et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:14822-14827, 2003; C, de B. Alberts et al., *Molecular Biology of the Cell*, 4th ed. New York: Garland Science, 2002.; D, de G. Obmolova, C. Ban, P. Hsieh e W. Yang, *Nature* 407:703-710, 2000.)

Ainda, outros erros de cópia mais sutis cometidos pela DNA polimerase, como a incorporação de uma base não-apropriada em uma sequência que não é de repetição, podem ser detectados e apagados pelas proteínas de reparo de pareamento errôneo, que são altamente sensíveis a saliências ou voltas na dupla hélice causadas por nucleotídeos incorporados de forma inadequada. A maquinaria de reparo de pareamento errôneo deve ser capaz de distinguir a fita recém-sintetizada da fita complementar “parental” que serviu como molde; isso permite que o aparato MMR direcione sua atenção para remover e reparar a fita recém-sintetizada e, portanto, defeituosa (veja a Figura 12.8C). O reparo de pareamento errôneo envolve a excisão dos nucleotídeos que originaram a falha no pareamento e uma nova tentativa de sintetizar essa fita.

Trabalhando juntos, esses diversos mecanismos de correção de erro originaram taxas extremamente baixas de bases copiadas erroneamente que sobreviveram para tornar-se sequências de DNA mutantes. Para começar, as DNA polimerases cometem erros de cópia em apenas um em cada 10^5 nucleotídeos polimerizados. A correção de erro 3'-para-5' das polimerases percebe um em cada 10^2 nucleotídeos inicialmente copiados erroneamente pela polimerase, reduzindo, assim, a taxa de erro para um em cada 10^7 nucleotídeos. Após a DNA polimerase já ter passado por toda a extensão do DNA, as proteínas de reparo de pareamento errôneo verificam a fita de DNA recém-sintetizada uma segunda vez. As enzimas de reparo de pareamento errôneo falham na correção de apenas uma base erroneamente sintetizada dentre um grupo de cem que escaparam da atenção da correção realizada pela DNA polimerase. Junto, isso origina uma taxa de mutação surpreendentemente baixa de apenas um nucleotídeo para cada 10^9 que foram sintetizados durante a replicação do DNA. Conforme veremos, defeitos nesses mecanismos de correção de erro podem levar a cânceres familiares e esporádicos.

Finalmente, a replicação de DNA ocasiona ainda outros perigos para o genoma. Algumas medidas indicam que até 10 quebras de dupla-fita (ds) ocorram por genoma celular cada vez que uma célula passa pela fase S. Essas quebras parecem ocorrer próximo a forquilha de replicação, ostensivamente porque a fita simples de DNA na porção desenrolada, mas não ainda replicada, do DNA parental é suscetível a quebras inadvertidas (Figura 12.10). As células desenvolveram mecanismos para lidar com tais quebras de dsDNA, como veremos depois. Falhas ao reparar tais quebras de forma apropriada podem levar a consequências desastrosas, incluindo quebras cromossômicas e translocações.

12.5 Genomas celulares estão sob ataque constante de processos bioquímicos endógenos

Muitas das narrativas das origens da pesquisa contemporânea do câncer contêm uma forte ênfase nas ações dos agentes carcinogênicos que entram no corpo através de diversas rotas, atacam moléculas de DNA dentro das células e criam genomas celulares mutantes que ocasionalmente causam a formação de células cancerígenas. Não reconhecidos por esses modelos de câncer estão os mutágenos e os mecanismos mutagênicos de origem endógena. Em décadas recentes, no entanto, técnicas analíticas de sensibilidade bastante aumentada permitiram que os pesquisadores detectassem bases e nucleotídeos alterados no DNA de células normais que não haviam sido expostas a mutágenos. Os resultados dessas análises causaram uma modificação profunda no pensamento sobre a origem de muitos genes mutantes presentes no genoma de células humanas, já que eles demonstraram que processos bioquímicos endógenos geralmente oferecem uma contribuição muito maior para mutações no genoma do que mutágenos exógenos. Já que eventos mutagênicos, independentemente de sua origem, são potencialmente carcinogênicos, isso forçou uma reconsideração sobre a forma como muitos cânceres humanos surgem.

A estrutura da dupla hélice de DNA, com suas bases viradas para dentro, oferece uma medida de proteção a todos os tipos de ataques químicos, protegendo seus grupos químicos potencialmente reativos, notavelmente as cadeias laterais de amina das bases, de vários agentes mutagênicos. Apesar dessa estrutura inteligente, as moléculas de DNA estão sujeitas a altera-

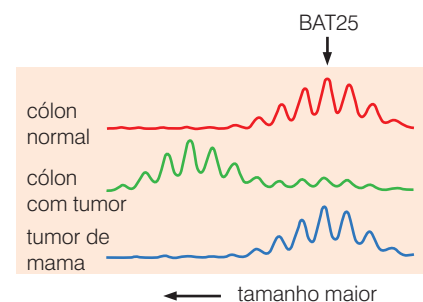
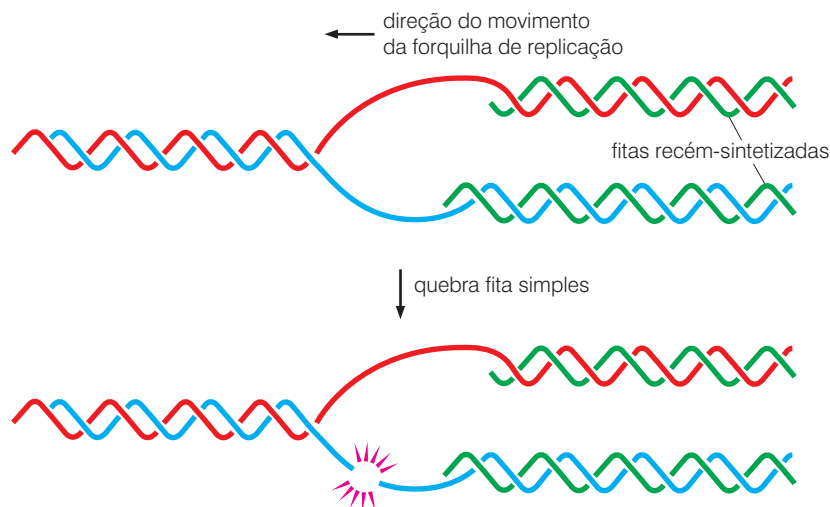


Figura 12.9 Detecção da instabilidade de microssatélites A instabilidade de microssatélites (MIN) frequentemente causa uma expansão ou contração no tamanho de uma sequência de repetição microssatélite. Na análise mostrada aqui, o tamanho de uma repetição de mononucleotídeos é revelado utilizando a técnica de PCR (reação em cadeia da polimerase), na qual os iniciadores ligam-se a sequências que flanqueiam a repetição em ambos os lados. A sequência BAT25, localizada no cromossomo 4q12 humano, consiste na sequência TTTTxxTTTxxT25, em que “x” indica outro nucleotídeo que não T. Devido a erros cometidos pela polimerase utilizada na reação de PCR, os produtos da reação apresentam uma distribuição gaussiana dos tamanhos agrupados ao redor de um produto de PCR que representa o tamanho real do segmento de DNA genômico que está sendo amplificado. Esta análise mostra os tamanhos de uma repetição microssatélite de uma mulher sofrendo de HNPCC (câncer hereditário de cólon sem polipose) diagnosticado tanto com carcinomas de mama quanto de cólon; o gráfico do DNA de tecido normal adjacente ao carcinoma de cólon também foi analisado. Esta análise revelou um aumento claro no tamanho das repetições microssatélites no carcinoma de cólon (*inclinação para a esquerda*), enquanto o tumor de mama exibe uma repetição de microssatélites precisamente igual ao DNA normal, controle. (Essa observação sugere fortemente que o carcinoma de mama, ao contrário do carcinoma de cólon, dificilmente foi formado por MIN.) (De A. Muller, T. B. Edmonston, D. A. Corao et al., *Cancer Res.* 62:1014-1019, 2002.)

Figura 12.10 Quebras no DNA dupla-fita nas forquilha de replicação. Durante a replicação do DNA, moléculas de DNA estão especialmente vulneráveis à quebra nas porções da molécula próximas à forquilha de replicação que ainda não sofreu replicação. A quebra resultante é funcionalmente equivalente a uma quebra de DNA dupla-fita ocorrendo em uma dupla hélice já formada, na qual a quebra deixa duas hélices desconectadas em ambas as fitas.



ções químicas e danos físicos. Alguns desses danos parecem ocorrer por meio da ação do hidrogênio e de íons hidroxila presentes em concentrações baixas ($\sim 10^{-7}M$) em pH neutro. Frequentemente citado nesse contexto está o processo de **depurinação**, no qual a ligação química unindo uma base púrica (adenina ou guanina) à desoxirribose quebra-se espontaneamente (Figura 12.11A). De acordo com algumas estimativas, até 10 mil bases púricas são perdidas por depurinação a cada dia em uma célula de mamífero. (Essa quantidade representa mais do que 10^{17} nucleotídeos quimicamente alterados gerados a cada dia no corpo humano!) A **depirimidinação** ocorre com uma taxa de 20 a 100 vezes menor, mas ainda resulta em até 500 bases de citosina e timina perdidas por célula por dia. Estimativas do nível estacionário de nucleotídeos que não possuem bases presentes em um único genoma humano vão de 4 mil a 50 mil.

Ao mesmo tempo, a **desaminação**, processo no qual os grupos amina que se protendem dos anéis das bases de guanina, adenina e citosina são perdidos, pode ocorrer. Essa desaminação leva, respectivamente, a xantina, hipoxantina e uracila (Figura 12.11B). A uracila, por sua vez, pode ser lida, em seguida, como uma timina durante a replicação subsequente do DNA, causando, assim, uma mutação pontual C-T, conhecida como mutação de **transição**, na qual uma pirimidina substitui outra. As bases geradas por desaminação são todas estranhas para o DNA normal, e, conseqüentemente, podem ser reconhecidas como tal e removidas pelas enzimas de reparo de DNA. No entanto, quaisquer bases alteradas que escaparem da detecção e remoção por essas enzimas de reparo representam fontes em potencial para mutações pontuais.

A desaminação espontânea da 5-metilcitosina – a forma metilada da citosina que encontramos anteriormente (Seção 7.8) – ocorre ainda mais frequentemente, originando a timina (veja a Figura 12.11B). Isso cria um problema sério para o aparato de reparo de DNA, já que a timina (ao contrário dos outros três produtos de desaminação descritos anteriormente) é um componente normal do DNA, e o par de bases T:G pode, dessa forma, escapar da detecção, sobreviver e, por último, servir como molde durante um ciclo subsequente de replicação de DNA, levando a uma mutação pontual C-para-T.

De fato, essa desaminação da 5-metilcitosina representa uma grande fonte de mutações pontuais no DNA humano. De acordo com uma estimativa, 63% das mutações pontuais nos genomas de tumores de órgãos internos (i. e., nos tecidos protegidos de radiação UV) surgem de seqüências CpG. Entre os alelos mutantes de *p53*, em torno de 30% parece ter surgido a partir de seqüências CpG presentes no genoma tipo selvagem do alelo *p53*. (Mais precisamente, essa percentagem é aumentada em parte pelo fato de que, durante o carcinoma de pulmão, seqüências CpG metiladas também são alvos favorecidos para o ataque de formas quimicamente ativadas do benzo[*a*]pireno [veja a Seção 12.6], um **hidrocarboneto aromático policíclico** [PAH] presente na fumaça do tabaco. Então, nem todas as mutações surgindo de sítios CpG derivam de eventos de desaminação.)

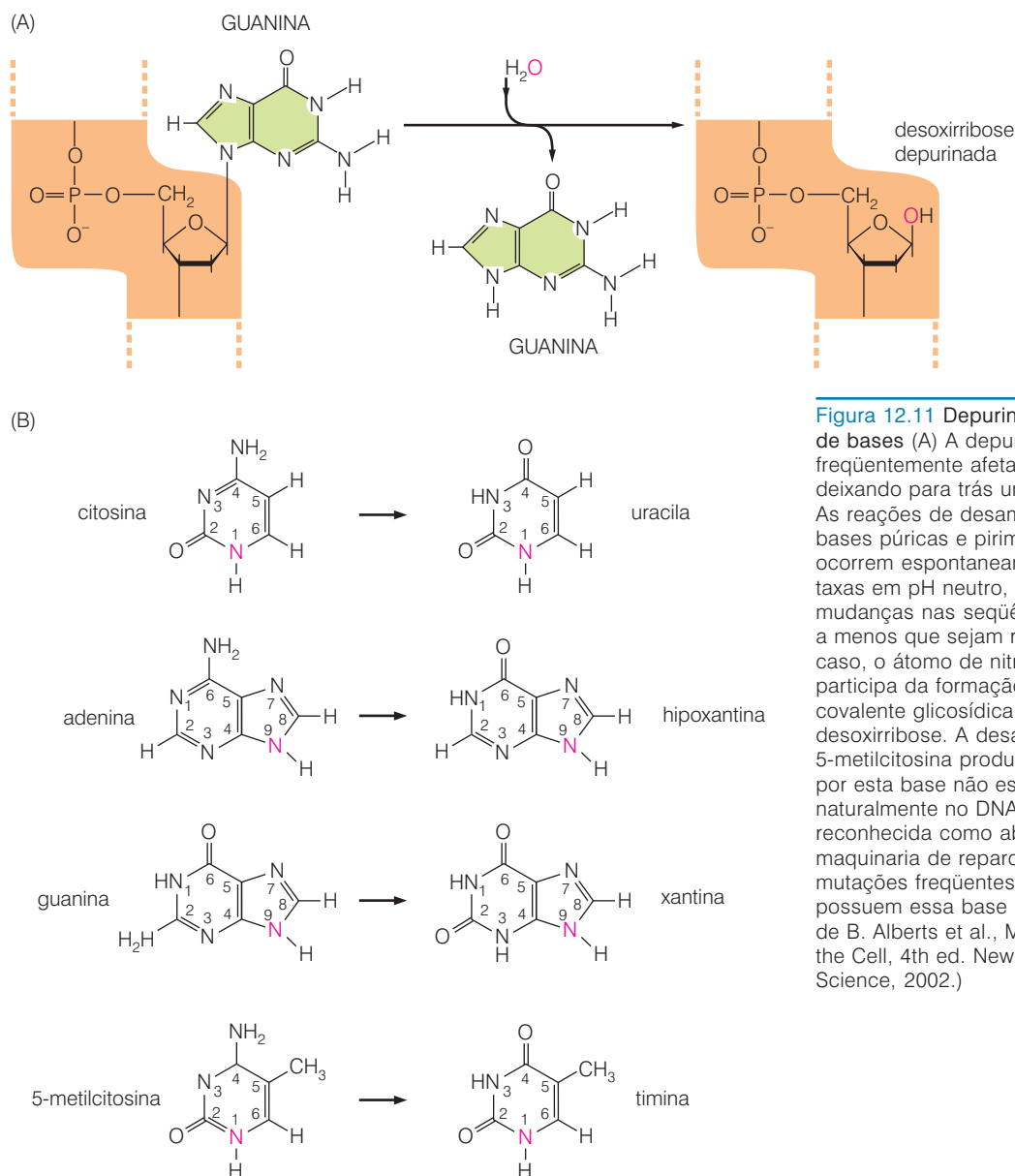
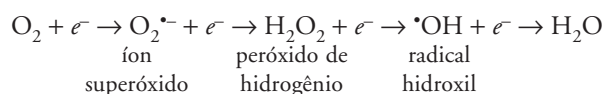


Figura 12.11 Depurinação e desaminação de bases (A) A depurinação espontânea frequentemente afeta a guanina do DNA, deixando para trás uma desoxirribose. (B) As reações de desaminação afetando bases púricas e pirimidínicas, que ocorrem espontaneamente a diferentes taxas em pH neutro, ocasionam mudanças nas seqüências nucleotídicas, a menos que sejam reparadas. Em cada caso, o átomo de nitrogênio em vermelho participa da formação de uma ligação covalente glicosídica no carbono 1 da desoxirribose. A desaminação da 5-metilcitosina produz a timina (*abaixo*); por esta base não estar presente naturalmente no DNA, ela não é sempre reconhecida como aberrante pela maquinaria de reparo, explicando as mutações frequentes em locais que possuem essa base metilada. (Adaptada de B. Alberts et al., *Molecular Biology of the Cell*, 4th ed. New York: Garland Science, 2002.)

O ambiente intracelular traz ainda outros perigos para o DNA cromossomal. O maior vem dos processos de oxidação, que podem infligir muito mais dano ao DNA do que as reações mencionadas anteriormente. São mais importantes aqui as reações que ocorrem na mitocôndria e geram uma variedade de intermediários à medida que o oxigênio é progressivamente reduzido à água:



Alguns desses intermediários, as chamadas espécies reativas de oxigênio (ROS), podem escapar da mitocôndria para o citosol e, posteriormente, para o resto da célula. Dentre tais intermediários, incluem-se o íon superóxido, o peróxido de hidrogênio e o radical hidroxil – os intermediários das reações listadas anteriormente. Outros oxidantes, ainda, surgem como subprodutos de diversas enzimas que utilizam oxigênio, incluindo aquelas dos **peroxissomos**

(corpos citoplasmáticos que estão envolvidos na oxidação de diversos constituintes celulares, principalmente lipídeos) e da oxidação espontânea de lipídeos, que resulta em sua peroxidação. A inflamação também é uma fonte importante de oxidantes que favorecem a mutagênese e, portanto, a carcinogênese (Barra lateral 12.3).

As moléculas altamente reativas produzidas por esses diversos processos prosseguem, em geral, em segundos, para formar ligações covalentes com muitas outras espécies moleculares na célula. Dentre esses muitos alvos de ataque pelas espécies reativas de oxigênio, estão as bases do DNA, incluindo tanto purinas quanto pirimidinas (veja a Figura 12.12). Além disso, as espécies reativas de oxigênio podem induzir quebras no DNA simples e dupla fita (Figura 12.11A), locais **apurínicos** ou **apirimidínicos** (juntos, conhecidos como sítios **abásicos**, nos quais as bases são clivadas para fora da desoxirribose; p. ex., veja a Figura 12.11A), bem como ligações cruzadas entre DNA e proteínas. Conforme descrito a seguir, muitas das bases alteradas resultantes são reconhecidas por uma maquinaria de reparo que prossegue para excisá-las do DNA. Algumas das bases excisadas, incluindo a timina glicol, que deriva da desoxitimidina glicol, e a 8-oxoguanina, que deriva da 8-oxo-desoxiguanosina (8-oxo-dG), podem ser detectadas e quantificadas na urina de mamíferos, fornecendo alguma indicação da taxa na qual elas são produzidas em todo o corpo (Barra lateral 12.4).

Alguns experimentos têm mostrado que a formação desses compostos é diretamente proporcional à taxa do metabolismo oxidativo em diversas espécies (Figura 12.13). A formação de 8-oxo-dG origina uma mutação perigosa, já que uma conformação dessa base alterada pode parear facilmente com um A. Essa falha de pareamento de bases na hora da replicação do DNA pode levar, por sua vez, à substituição de um par de bases G:C, via um pareamento G:A, por um par de bases T:A (veja a Figura 12.12B). Tal substituição G→T, de uma purina por uma pirimidina (ou o oposto) é freqüentemente chamada de **transversão**. Outro dano também pode ocorrer por meio da metilação de bases desencadeada por uma reação com a S-adenosil-selenometionina, um intermediário metabólico comum nas células que carrega um grupo metil. Tomados juntos, o rastro contínuo de dano da oxidação, depurinação, desaminação e metilação podem alterar milhares de bases por genoma celular por dia, excedendo em muito a quantidade de erros criada por agentes mutagênicos exógenos na maioria dos tecidos.

Barra lateral 12.3 A inflamação pode possuir consequências mitogênicas e mutagênicas A inflamação crônica dos tecidos é freqüentemente provocada por certos agentes infecciosos, como em infecções pelos vírus da hepatite B e C no fígado, infecções por *Helicobacter* no epitélio gástrico e infecções no epitélio cervical pelo papilomavírus humano (HPV) (Seção 11.15). Essas infecções levam à morte celular e a uma proliferação compensatória resultante das células sobreviventes – um tipo de promoção de tumor discutida no capítulo anterior.

Essas respostas inflamatórias também podem possuir consequências mutagênicas diretas. Vejamos como. O sistema imune despacha células, notavelmente macrófagos e neutrófilos, para locais de infecção; essas células **fagocíticas** destroem e consomem células infectadas em tecidos infectados. De maneira importante, tais fagócitos matam células, em parte liberando grandes quantidades de uma mistura poderosa de oxidantes, que inclui óxido nítrico (NO), íon superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e hipoclorito (OCl^-). Essas espécies químicas altamente reativas matam as células-alvo que pretendiam, mas, junto a estas, podem causar danos colaterais, deixando para trás um número significativo de sobreviventes cujos genomas elas também danificaram. Como os subprodutos do metabolismo oxidativo normal, esses oxidantes agem como mutágenos nos genomas de células espectadoras nas redondezas por meio de sua capacidade de gerar bases quimicamente modificadas por nitração, oxidação, desaminação e halogenação. De fato, os DNAs de tecidos inflamados e neoplásicos foram descobertos como possuidores de concentrações substancialmente aumentadas de 8-oxo-dG (veja a Figura 12.12), um dos principais produtos da oxidação do DNA. A taxa de mutação aumentada nas células que possuem tais bases oxidadas ajuda a explicar por que inflamações crônicas, em muitos tecidos, favorecem a progressão de tumor.

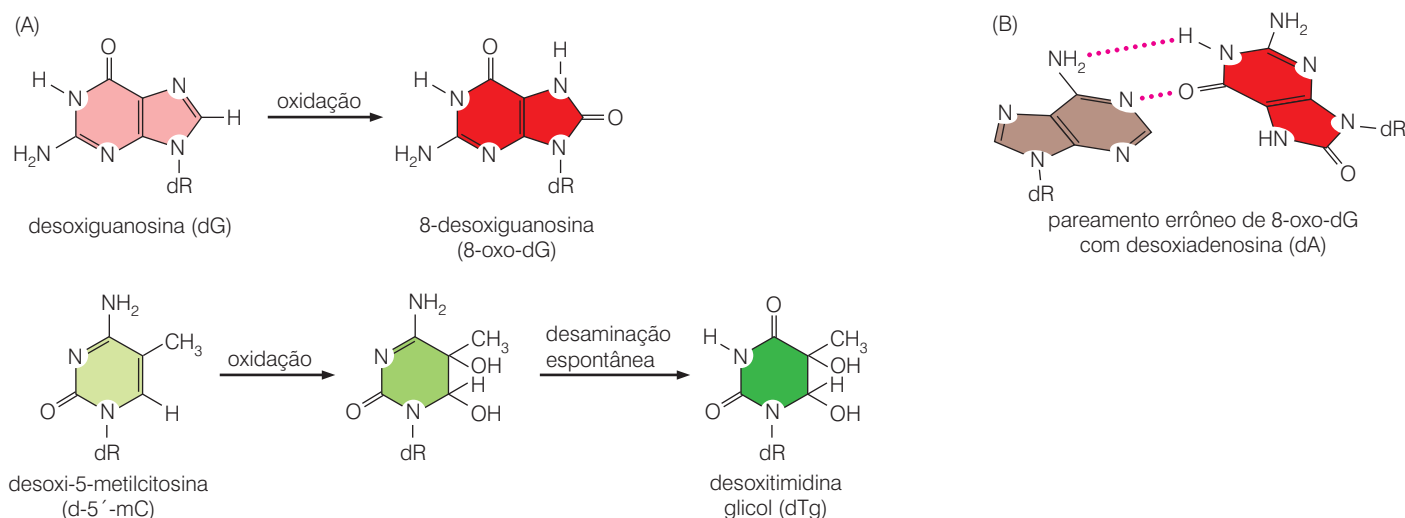


Figura 12.12 Oxidação das bases do DNA A oxidação das bases do DNA, que frequentemente resulta das ações de espécies reativas de oxigênio (ROS), pode ser mutagênica na ausência de reações de reparo de DNA subsequentes. (A) Duas reações frequentes de oxidação envolvem a desoxiguanosina (dG), que é oxidada a 8-oxo-desoxiguanosina (8-oxo-dG); e desoxi-5-metilcitosina (d-5'-mC), o nucleotídeo que está presente em seqüências CpG metiladas. Na oxidação, esta última forma uma base instável que é rapidamente desaminada, originando a desoxitimidina glicol (dTg). (B) A 8-oxo-

dG, que é formada pela oxidação de dG, pode parear erroneamente com a desoxiadenosina (dA), em vez de formar um par de bases normal com desoxicitosina (dC). Então, se 8-oxo-dG não for removida da dupla hélice, a maquinaria de replicação de DNA pode incorporar inapropriadamente uma dA em vez de uma dC, resultando em uma mutação pontual C-A. "dR" significa desoxirribose em todos os casos. As purinas são mostradas em diversos tons de *vermelho* e *marrom*, enquanto as pirimidinas são mostradas em diversos tons de *verde*.

12.6 Genomas celulares estão sob ataque ocasional de mutágenos e seus metabólitos

Conforme vimos repetidamente neste texto, genomas celulares também são danificados por carcinógenos exógenos, incluindo vários tipos de radiação, bem como moléculas que entram no corpo pela comida que comemos e pelo ar que respiramos. Entre os carcinógenos mais

Barra lateral 12.4 Produtos da oxidação na urina fornecem uma estimativa da taxa de dano ocorrendo no genoma celular De acordo com estimativas recentes, os genomas de algumas células humanas sofrem até 10^3 ataques oxidativos por dia, em torno de 10 vezes menos do que a taxa na qual a depuração de bases ocorre. As bases oxidadas resultantes são bastante, mas não totalmente, removidas e substituídas pelas bases normais apropriadas. Células de rato sofrem em torno de 10 vezes mais ataques oxidativos por célula por dia em seus genomas do que células humanas, porque eles possuem uma taxa metabólica sete vezes mais elevada (Figura 12.13). Qualquer lesão oxidativa não-reparada irá se acumular com o tempo, especialmente nos genomas de células que não são mitoticamente ativas.

A 8-oxo-dG é o nucleotídeo que resulta de dano oxidativo mais frequentemente observado. Parece que 1 a 2% desses nucleotídeos oxidados falham ao serem removidos pelo aparato de reparo de DNA. Os oxidantes podem oxidar o precursor nucleotídico de dG antes que ele seja incorporado ao DNA; o nucleosídeo trifosfatado oxidado pode então ser incorporado ao DNA, em vez do dGTP. Alternativamente, os oxidantes podem atacar a base guanina após sua incorporação ao DNA. A importância de dGTP oxidada (i. e., 8-oxo-dG trifosfato) é indicada pelo fato de que uma enzima especial – MTH1 – é utilizada por células

de mamífero para degradar esse precursor de DNA oxidado; camundongos que não possuem MTH1 desenvolveram tumores em uma taxa 3 a 4 vezes maior do que seus correspondentes do tipo selvagem. (Outra enzima ainda altamente especializada, chamada MUTYH, excisa adeninas que foram incorporadas erroneamente para se oporem a 8-oxo-dG no DNA.) A 8-oxo-dG excisada do DNA é muito excretada na urina.

Infelizmente, as análises dos produtos de oxidação do DNA estiveram sujeitas a muitos artefatos, incluindo a oxidação inadvertida do DNA e nucleosídeos *in vitro*. Em uma ocasião, alíquotas de uma preparação de DNA foram enviadas para 21 laboratórios da Europa para medidas do conteúdo de 8-oxo-dG; as análises resultantes produziram estimativas variando em um fator de mais de 200. As estimativas de número de bases oxidadas diminuíram dramaticamente nos últimos anos. Ainda assim, as estimativas novas, mais conservativas, posicionaram o nível estacionário de resíduos de 8-oxo-dG do DNA isolado de uma média de células humanas em torno de 3 mil. Esses níveis estacionários são comparáveis aos níveis de bases quimicamente alteradas que são formadas no DNA de um tecido-alvo que foi exposto a doses altas e carcinogênicas de compostos como aflatoxinas e aminas heterocíclicas.

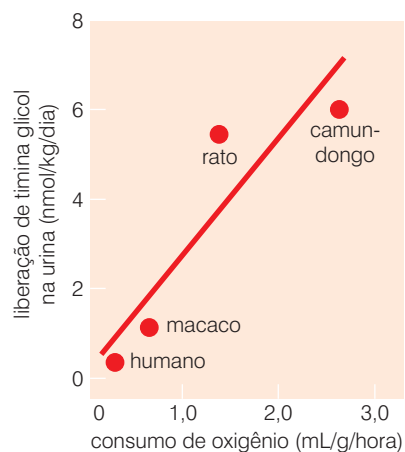


Figura 12.13 Taxa metabólica e oxidação de DNA A taxa metabólica, e, portanto, a taxa de consumo de oxigênio, varia inversamente com o tamanho do corpo em mamíferos, sendo em torno de uma ordem de magnitude maior em roedores do que em humanos. Conforme indicado aqui, um maior consumo de oxigênio (mL de O_2 por grama de peso corporal por hora, *abscissa*) está correlacionado com um aumento na taxa de oxidação de bases do DNA, ostensivamente criada por ROS que são subprodutos da fosforilação oxidativa na mitocôndria. Timina glicol (*ordenada*) é o produto da excisão do DNA da base pirimídica presente na desoxitimidina glicol (veja a Figura 12.12), um dos produtos mais comuns da oxidação do DNA; essa base é eventualmente excretada na urina. A taxa de excreção de 6 nmol por quilograma de peso corporal por dia medida em camundongos e ratos corresponde a cerca de 3 mil timidinas oxidadas por célula por dia. (De B. N. Ames, *Free Radic. Res. Com.* 7:121-128, 1989; e de B. N. Ames e L. S. Gold, *Mutat. Res.* 250:3-16, 1991.)

bem-estudados estão os raios X, freqüentemente chamados de “radiação ionizante” devido às moléculas ionizadas, quimicamente reativas, que essa forma de energia eletromagnética cria nas células. Acredita-se que até 80% da energia depositada nas células por raios X sejam gastos na remoção de elétrons de moléculas de água. Os radicais livres resultantes prosseguem para gerar espécies reativas de oxigênio (ROS). Os raios X podem alterar o DNA, já que freqüentemente geram radicais livres que criam quebras de dupla ou simples fita na dupla hélice. Conforme será discutido a seguir, essas quebras de dupla-fita são freqüentemente difíceis de serem reparadas e podem, em alguma ocasião, gerar quebras em um cromossomo que podem ser vistas ao microscópio durante a metáfase.

A radiação ultravioleta (UV) do sol é uma fonte mais comum de radiação ambiental do que os raios X. Organismos vivos tiveram de conviver com a radiação UV desde que a vida se formou pela primeira vez neste planeta, há 3,5 bilhões de anos. Uma vez que o oxigênio se acumulou até níveis altos na atmosfera, cerca de 0,6 bilhões de anos atrás, o ozônio formado a partir do oxigênio atmosférico providenciou um escudo protetor que atenuou significativamente o fluxo de radiação UV atingindo a superfície da Terra. Apesar disso, uma quantidade significativa de UV ainda obtém sucesso na penetração do escudo de ozônio e alcança a biosfera.

Caso fótons de UV atinjam moléculas de DNA em alguma de nossas células da pele, uma consequência freqüente seria a formação de dímeros de pirimidina – ou seja, ligações covalentes formam-se entre duas pirimidinas adjacentes na mesma fita de DNA. A princípio, essas ligações podem se formar entre dois Cs adjacentes, dois Ts adjacentes ou, ainda, entre um C e um T adjacentes. Em mamíferos, nos quais a porcentagem de As, Cs, Gs e Ts é similar, mais de 60% de dímeros de pirimidina são TT, e aproximadamente 30% são dímeros CT, com as dipirimidinas restantes sendo dímeros CC. Conforme visto na Figura 12.14, um par de ligações covalentes é formado entre pirimidinas adjacentes, resultando na criação de um anel com quatro carbonos (ciclobutano). Outra classe, menos comum, de fotoprodutos do DNA, chamados pirimidina (6-4) pirimidina, também envolve a ligação covalente entre duas pirimidinas adjacentes. Uma vez formados, dímeros de pirimidina são bastante estáveis e podem persistir por longos períodos no DNA, a menos que sejam reconhecidos e removidos por certas enzimas de reparo de DNA.

O fato de que esses dímeros de pirimidina são mutagênicos é demonstrado dramaticamente pelo espectro de mutações de *p53* encontradas nos DNAs de queratoses (lesões benignas de pele) e nos carcinomas de células basais da pele. Nesses crescimentos, muitos dos alelos mutantes de *p53* carregam uma substituição de dipirimidina. Enquanto o dímero TT é o mais freqüentemente formado pela radiação UV, ele é apenas fracamente mutagênico, já que diversas enzimas de reparo e replicação de DNA, a serem discutidas a seguir, são capazes de lidar efetivamente com ele. Isso explica por que substituições CC→TT, que surgem de dímeros de CC (em vez de TT), são as consequências mais comuns de mutagênese por luz UV. Já que os fótons de UV caracteristicamente causam essa mutação, essas observações fornecem maior suporte para a noção de que raios UV são diretamente mutagênicos e carcinogênicos para a pele humana. (Outra evidência para um papel causal direto da radiação UV é epidemiológica: a incidência de carcinomas de células escamosas da pele dobra a cada declínio de 10° na latitude, alcançando seu pico no equador, onde a exposição cumulativa ao UV é maior.) Como poderia se esperar, esse tipo particular de mutação na *p53* é, em outras circunstâncias, extremamente raro nos genomas de muitos tipos de tumores humanos que surgem em órgãos internos e estão, portanto, protegidos da radiação UV.

Diversas espécies químicas podem entrar no corpo, sofrer modificações químicas e então prosseguir para reagir com as macromoléculas dentro das células, dentre estas, o DNA. Muitas dessas espécies químicas modificadas são **eletrofílicas**, ou seja, são moléculas que procuram e atacam regiões ricas em elétrons de moléculas-alvo. Entre os mutágenos mais potentes está uma classe de compostos, chamados agentes **alquilantes**, que são capazes de ligar covalentemente grupos alquila a bases de DNA (Figura 12.14C).

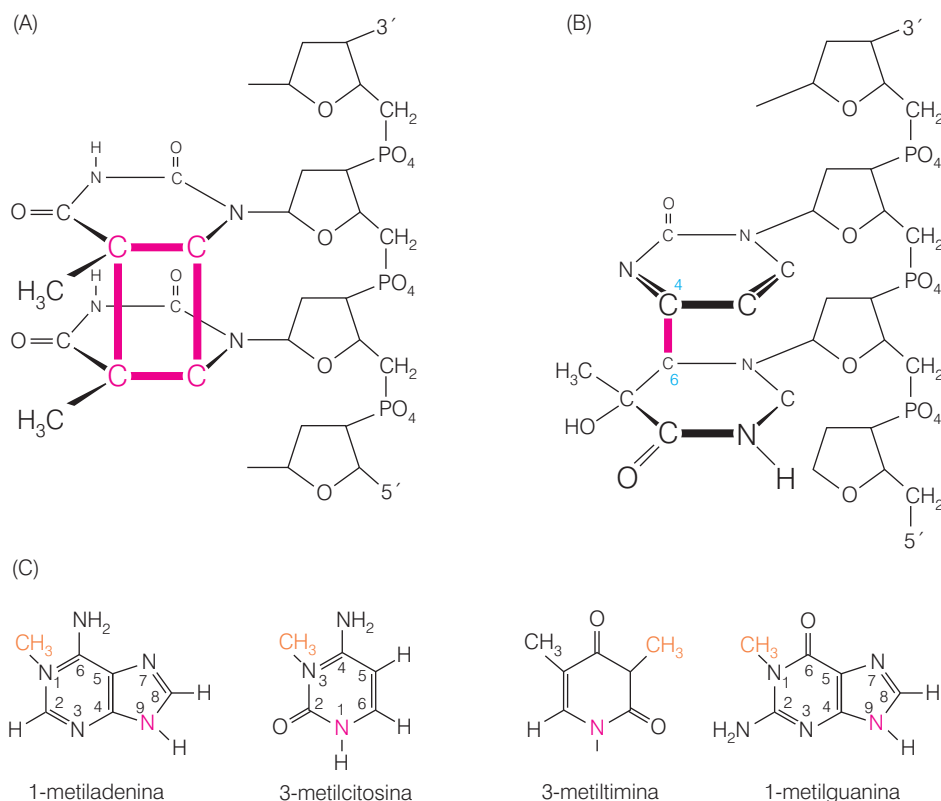


Figura 12.14 Produtos da irradiação UV e metilação do DNA. A radiação ultravioleta (UV) produz ligações covalentes cruzadas entre bases pirimídicas adjacentes no DNA. Quando DNA purificado é irradiado com fótons de 254 nm, 71% dos fotoprodutos formados resultantes são os dímeros ciclobutano de pirimidina (CPD; A), enquanto 24% dos fotoprodutos são de pirimidina (6-4) piridinona (6-4PP) (B). O anel de ciclobutano de CPD está destacado em *vermelho* no painel A, como a ligação unindo a posição 6 de uma pirimidina à posição 4 da pirimidina adjacente no painel B. Essas estruturas são relativamente estáveis e devem ser removidas pelo reparo acoplado à transcrição e pelo reparo genômico global (a ser descrito na Seção 12.8). (C) Agentes alquilantes exógenos podem alterar covalentemente as bases do DNA pela ligação de grupos alquila, como os grupos metila (*laranja*) mostrados aqui. Muitos desses grupos metila também podem ser gerados endogenamente pelas ações inadvertidas da S-adenosil metionina, que carrega um metil altamente reativo que desempenha um papel fundamental em muitas reações biossintéticas normais. Os nitrogênios que formam ligações glicosídicas com a desoxirribose estão mostrados em *rosa*.

A alquilação de uma base pode desestabilizar sua ligação covalente à desoxirribose, resultando na perda de uma base purica ou pirimídica do DNA. Alternativamente, as bases alquiladas podem ser lidas erroneamente pela maquinaria da DNA polimerase durante a replicação do DNA. Devido a sua mutagenicidade potente, agentes alquilantes com frequência são utilizados experimentalmente para induzir vários tipos de tumor em animais de laboratório. (Além disso, como certos agentes alquilantes que são utilizados clinicamente como quimioterápicos anticâncer são também potentes mutágenos, uma consequência retardada da quimioterapia pode ser o aparecimento, em um segundo local anatômico, de um novo tumor, induzido pela terapia.)

Um grande número de mutágenos potentes é formado quando compostos ingeridos ou inalados tornam-se alterados por processos metabólicos ocorrendo dentro de nossas células. Podemos citar como exemplo o benzo[*a*]pireno (BP), um carcinógeno potente que se encaixa na classe dos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs), ou seja, moléculas que carregam múltiplos anéis de benzeno fusionados em várias combinações (veja a Figura 2.22). Experimentos conduzidos na Inglaterra, no final de 1920, indicaram que esse composto é um carcinógeno proeminentemente encontrado entre a mistura complexa de compostos no alcatrão de hulha.

Um arranjo elaborado de enzimas pertencentes à classe das enzimas do citocromo P-450 (CyPs) é liberado pela célula para oxidar hidrocarbonetos policíclicos. (Os genes para 46 P-450 distintas já foram descobertos no genoma humano.) O objetivo da célula é detoxificar essas espécies químicas que vêm de fora e convertê-las em moléculas que são solúveis e podem ser facilmente excretadas (Figura 12.15A). No entanto, uma consequência inadvertida dessa detoxificação é, frequentemente, a criação de espécies químicas que são altamente reativas com o DNA e são, portanto, ativamente mutagênicas (Figura 12.15B). Como consequência, *procarcinógenos* quimicamente inertes e não-reativos são convertidos em *carcinógenos terminais*, altamente reativos, que podem atacar diretamente moléculas de DNA pela sua capacidade de formar ligações covalentes com várias bases. A entidade química formada após a reação de um carcinógeno com uma base de DNA é frequentemente denominada **aduto de DNA** (Figura 12.16).

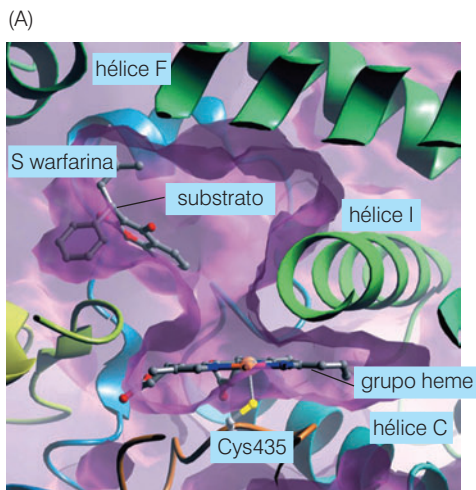


Figura 12.15 Ações dos citocromos em procarcinógenos (A) Os citocromos P450 (CyPs) estão envolvidos na biossíntese de diversos metabólitos, como hormônios esteróides, colesterol e ácidos da bile, além da degradação de compostos como ácidos graxos e esteróides. Junto a isso, eles são usados para auxiliar na oxidação e detoxificação associada de diversos *xenobióticos* (compostos originários de fora do corpo), como drogas e carcinógenos. A cavidade de ligação do substrato da CYP2C9 humana, mostrada aqui, carrega uma molécula de substrato xenobiótico, neste caso a warfarina (usada tanto como droga anticoagulante quanto como veneno de rato; *substrato, acima*). A molécula de warfarina está justaposta ao anel heme (*abaixo*), que atua oxidando a warfarina, e, assim, detoxificando-a. A grande cavidade de ligação do substrato das CyPs permite que elas acomodem uma vasta gama de substratos, muitos dos quais são bastante hidrofóbicos. (B) Dentre os compostos xenobióticos que entram no corpo estão uma grande variedade de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs) que derivam da fumaça do tabaco, comidas assadas e ambientes poluídos. Um PAH comum é o benzo[a]pireno (BP, *mais à esquerda*), o qual, seguindo duas reações de oxidação mediadas por enzimas do citocromo P450 (principalmente CYP1A1), é convertido em benzo[a]pirenodiolepóxido (BPDE) (*mais à direita*). Esta molécula altamente reativa é chamada de *carcinógeno terminal* (Seção 2.9), pois, ao contrário de seu precursor BP, é capaz de atacar diretamente bases de DNA e formar adutos covalentes, que frequentemente geram mutações oncogênicas. (A, de P. A. Williams, J. Cosme, A. Ward et al., *Nature* 424:464-468, 2003; B, de E. C. Miller, *Cancer Res.* 38:1479-1496, 1978.)

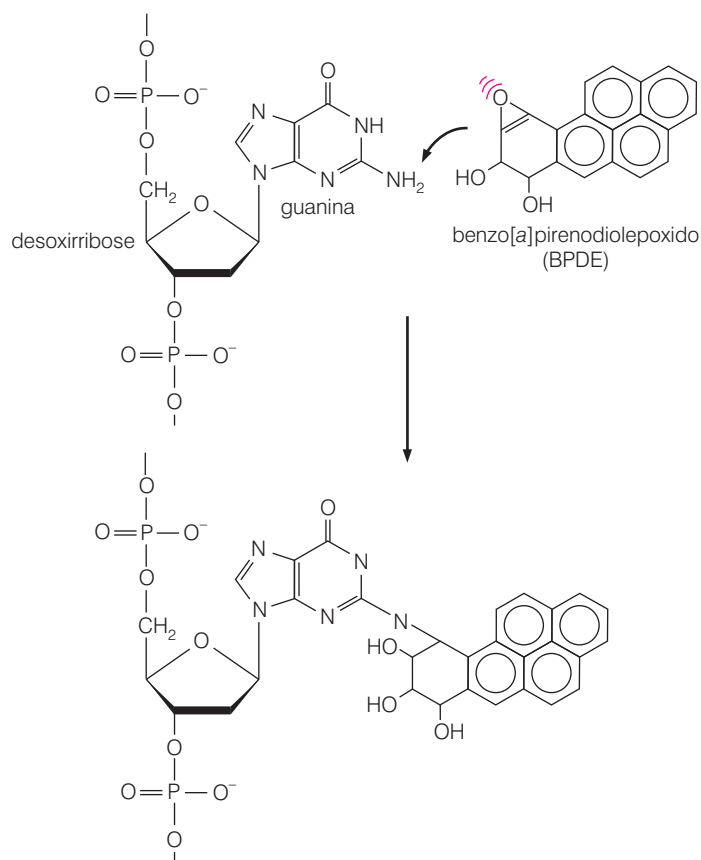
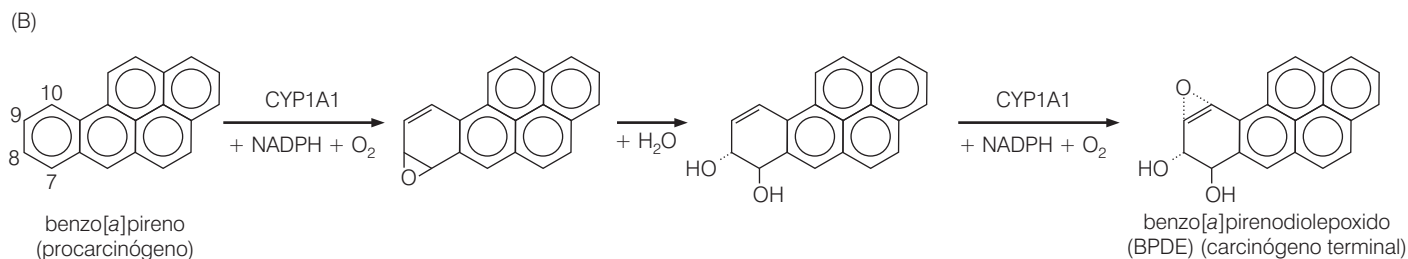


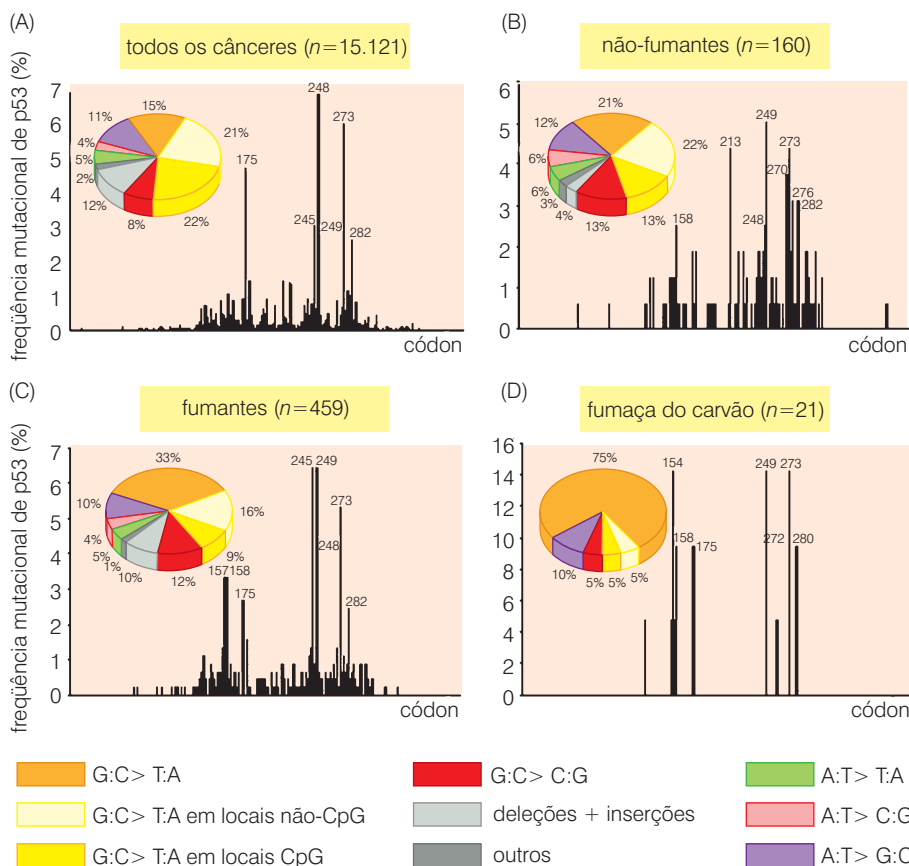
Figura 12.16 Adutos de DNA O grupo epóxido quimicamente reativo do benzo[a]pirenodiolepóxido (BPDE; veja a Figura 12.15B) pode atacar diversas posições químicas do DNA, incluindo a amina extracíclica da guanina (*mostrada aqui*) e os dois anéis de nitrogênio e o O⁶ dessa base (*não-mostrado*). Como a célula pode remover esses diversos adutos com eficiências diferentes, o aduto O⁶ de BP pode ser mais potencialmente mutagênico do que os adutos mais frequentemente formados mostrados aqui. Ainda que hidrocarbonetos aromáticos policíclicos venham sendo estudados por mais de meio século, sua contribuição precisa para o desenvolvimento de cânceres humanos permanece matéria de debate, ainda que evidências indiretas forneçam sugestões fortes de um papel importante (veja a Figura 12.17).

Na maioria dos casos, carcinógenos terminais, quimicamente reativos, atacam outras moléculas quase imediatamente após terem sido formados. Como consequência, eles possuem tempos de vida como moléculas livres que são medidas em segundos; isso determina que muitas das lesões genéticas criadas por carcinógenos ativados surjam nas mesmas células nas quais essas moléculas sofreram a ativação metabólica inicial. Por exemplo, o benzo[*a*]pireno (BP), citado anteriormente como um importante componente carcinogênico do alcatrão de hulha, é também um proeminente componente carcinogênico da fumaça do tabaco. Por consequência, BP é freqüentemente ativado nas primeiras células em que ele entra – as células epiteliais dos pulmões de fumantes. Uma vez formado, o derivativo ativado, benzo[*a*]pirenodiolepoxido (BPDE), prossegue diretamente para formar adutos com os resíduos de guanosina no DNA dessas células epiteliais (veja a Figura 12.16), como sugeridos por algumas das características substituições de bases encontradas em alelos mutantes de *p53* de cânceres de pulmão resultantes (Figura 12.17).

Dentre os mais potentes carcinógenos exógenos está a aflatoxina B1 (AFB1), que é produzida por fungos pertencentes ao gênero *Aspergillus*. Esses fungos crescem em sementes de amendoim e grãos que não foram armazenados apropriadamente. As pessoas que vivem em áreas onde a exposição a AFB1 é alta possuem um risco três vezes mais elevado de desenvolverem um carcinoma hepatocelular (HCC), ao passo que as pessoas portadoras de uma infecção viral crônica por hepatite B (Seção 11.15) possuem um risco sete vezes maior de desenvolver essa doença. Em algumas áreas do mundo, indivíduos que sofrem essa infecção viral e também são expostos a comidas contaminadas com AFB1 possuem um risco 60 vezes maior de contrair câncer de fígado (Figura 12.18A).

Uma vez que AFB1 é ativado pelas Cyps no fígado, o metabólito resultante pode atacar bases guanina e formar um aduto de DNA por meio da ligação covalente a essa base (Figura 12.18B). AFB1 causa uma mutação G-para-T característica no DNA. Tais mutações pontuais, nas quais a

Figura 12.17 Mutações pontuais em *p53* causadas por mutágenos As mutações pontuais encontradas em alelos de *p53* carregados por células de cânceres humanos nos fornecem pistas sobre as identidades dos agentes mutagênicos responsáveis. (A) Todos os tipos de câncer; (B) cânceres de pulmão em não-fumantes; (C) cânceres de pulmão em fumantes; (D) cânceres de pulmão em não-fumantes expostos a emissões de fumaça do carvão. Em cada caso, o número de tumores analisado está indicado por *n*. Gráficos em forma de torta: transições G:C-para-T:A (i. e., G-para-T) foram encontradas em 15% de um de mais de 15 mil alelos mutantes de *p53* associados a diversos tumores humanos. No entanto, em carcinomas de pulmão de não-fumantes, 21% dos alelos mutantes de *p53* carregavam essa transição, enquanto 33% dos alelos mutantes de *p53* de cânceres de pulmão oriundos de fumantes de cigarro apresentavam essa transição, que estava presente em 75% dos cânceres de pulmão de não-fumantes que tiveram uma história de exposição repetida a emissões de fumaça do carvão. Essa transição G-para-T foi encontrada experimentalmente como induzida por benzo[*a*]pireno (BP), que é sabidamente presente nos produtos da combustão de combustíveis fósseis, bem como do tabaco. Gráficos em barra: Pistas adicionais sobre o processo mutagênico, cujo significado ainda não é claro, parecem ser fornecidas pelas localizações de várias mutações pontuais no gene de *p53* vistas em gráficos de barras. O número acima de cada barra designa o códon na sequência de leitura da *p53* humana que foi encontrada como afetada por uma mutação pontual. A ordenada indica a porcentagem dos tumores estudados de cada grupo que possuía mutações em cada um dos códons indicados ao longo da abscissa. (De A.I. Robles, S.P. Linke and C.C. Harris, *Oncogene* 21:6898-6907, 2002.)



seqüência AGG foi convertida em AGT, são encontradas no códon 249 do gene supressor de tumor *p53* em torno de metade dos carcinomas hepatocelulares que ocorrem em indivíduos expostos a esse carcinógeno. Essas mudanças características no DNA fornecem evidências significativas para a interação direta desse carcinógeno mutagênico e as bases do DNA.

Outro exemplo amplamente estudado de carcinógenos de origem exógena envolve as aminas heterocíclicas (HCAs), uma classe de moléculas que são formadas em grandes quantidades quando carnes de muitos tipos são cozinhadas a altas temperaturas (Figura 12.19A). Esses compostos surgem por meio de reações que ocorrem entre tipos de moléculas que ocorrem naturalmente na célula, principalmente creatina, glicose fosfatos, dipeptídeos e aminoácidos livres. Os HCAs são, sem dúvida alguma, carcinogênicos. Por exemplo, o mais abundante desses compostos de carnes cozinhadas a altas temperaturas – 2-amino-1-metil-6-fenilimidazo[4,5-b]piridina (PhIP) – é capaz de induzir carcinomas de cólon e mama em ratos e linfomas em camundongos. PhIP é reconhecido como sendo o principal HCA da dieta humana.

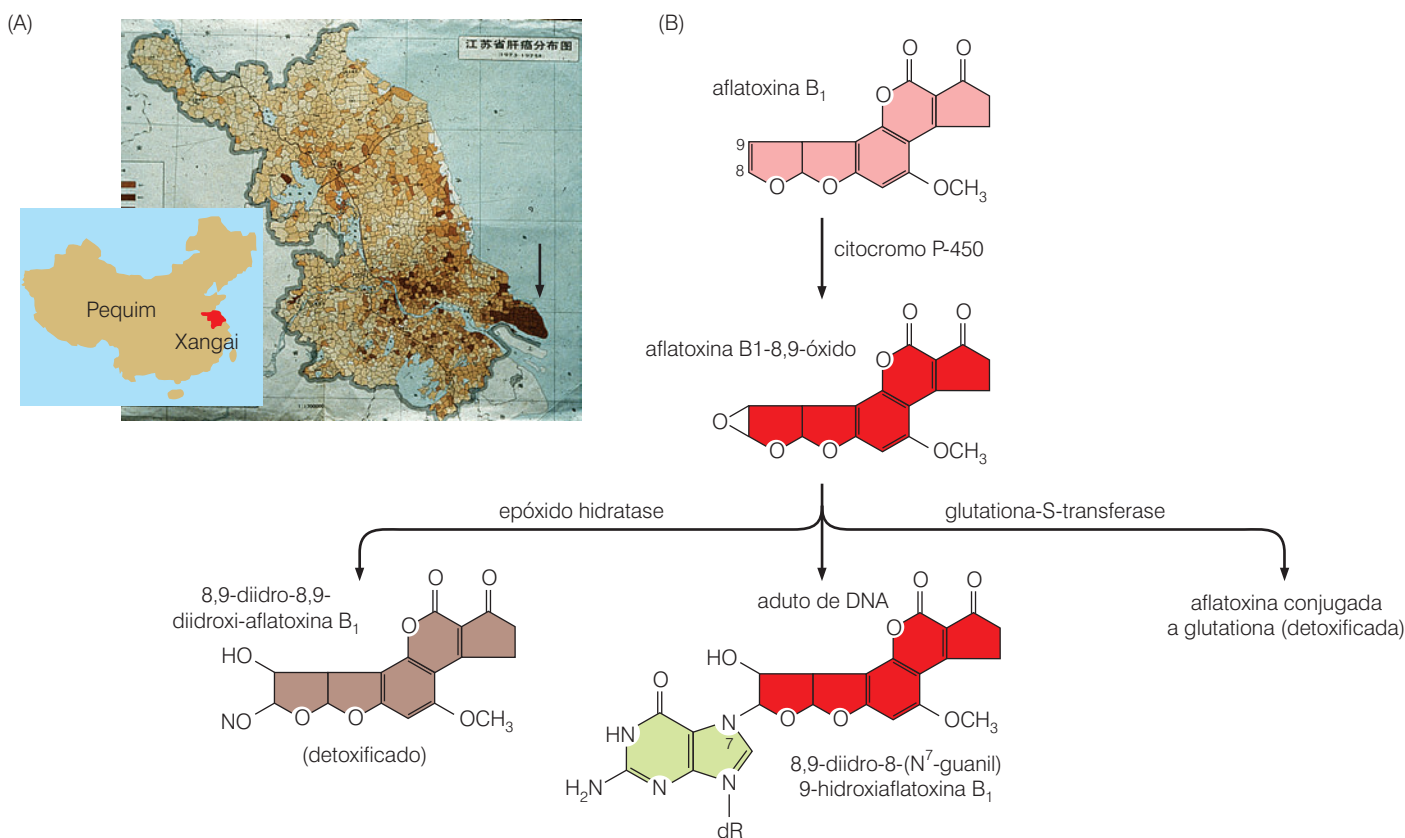


Figura 12.18 Aflatoxina e carcinogênese no fígado (A) A toxina fúngica aflatoxina B1 (AFB1) é produzida por um fungo que cresce em sementes de amendoim e grãos que foram armazenados de forma incorreta, principalmente se estes forem armazenados em áreas de alta precipitação e umidade. Na província Jiangsu ao leste da China, a incidência de casos de carcinoma hepatocelular (HCC, *pontos marrons*) é oito vezes maior na península muito úmida localizada ao sudeste, a península de Qidong (*seta*), do que nas partes mais a noroeste da província. A incidência da infecção pelo vírus da hepatite B (HBV) – um co-carcinógeno crítico na patogênese de HCC (Seção 11.15) – é relativamente constante ao longo da província. (B) A ativação de AFB1 (rosa) pelas citocromo P-450s resulta na forma 8,9-óxido (*vermelho*) que é altamente reativa. Isso pode ser detoxificado por meio de diversas

reações paralelas (*esquerda, abaixo, direita*). No entanto, essa forma ativada de AFB1 pode, com alguma frequência, reagir diretamente com o DNA, formando um aduto covalente com o átomo N⁷ da guanina (*verde-claro*) que é altamente mutagênico. De fato, os carcinomas de fígado de indivíduos que vivem em áreas de alta exposição a AFB1 frequentemente carregam alelos mutantes de *p53* com uma transverso característica de G-para-T no códon 249 – precisamente o tipo de mutação que seria esperada da conhecida reatividade de AFB1. (A, de T. W. Kensler, G. S. Qian, J. G. Chen and J. D. Groopman, *Nat. Rev. Cancer* 3:321-329, 2003; B de J. D. Groopman e L. G. Cain, in C. S. Cooper and P. L. Grover, eds., *Interactions of fungal and plant toxins with DNA in chemical carcinogenesis and mutagenesis*. Berlin: Springer Verlag, 1990.)

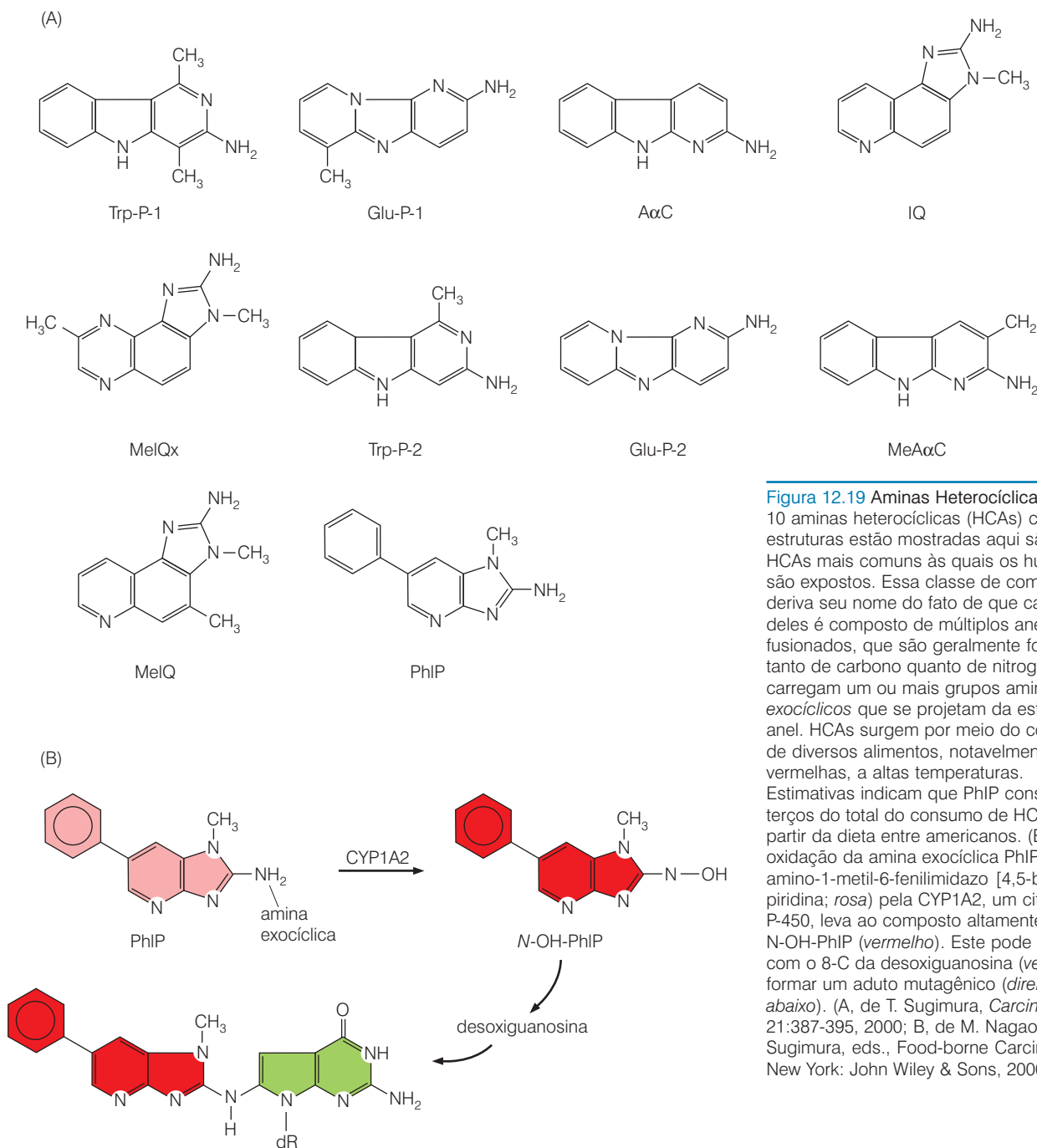


Figura 12.19 Aminas Heterocíclicas (A) As 10 aminas heterocíclicas (HCAs) cujas estruturas estão mostradas aqui são as HCAs mais comuns às quais os humanos são expostos. Essa classe de compostos deriva seu nome do fato de que cada um deles é composto de múltiplos anéis fusionados, que são geralmente formados tanto de carbono quanto de nitrogênio que carregam um ou mais grupos amina *exocíclicos* que se projetam da estrutura do anel. HCAs surgem por meio do cozimento de diversos alimentos, notavelmente carnes vermelhas, a altas temperaturas. Estimativas indicam que PhIP constitui dois terços do total do consumo de HCAs a partir da dieta entre americanos. (B) A oxidação da amina exocíclica PhIP (2-amino-1-metil-6-fenilimidazo [4,5-b] piridina; *rosa*) pela CYP1A2, um citocromo P-450, leva ao composto altamente reativo N-OH-PhIP (*vermelho*). Este pode reagir com o 8-C da desoxiguanosina (*verde*) para formar um aduto mutagênico (*direita, abaixo*). (A, de T. Sugimura, *Carcinogenesis* 21:387-395, 2000; B, de M. Nagao and T. Sugimura, eds., *Food-borne Carcinogens*. New York: John Wiley & Sons, 2000.)

Uma vez que as aminas heterocíclicas entraram na célula, Cyps são utilizadas por elas para oxidar tais moléculas. Algumas Cyps oxidarão os anéis das aminas heterocíclicas, ao passo que outras irão oxidar os grupos amina *exocíclicos*, ou seja, aqueles que se projetam dos anéis. A oxidação dos anéis pelas Cyps leva a uma detoxificação com sucesso; a oxidação dos grupos amina, no entanto, leva à formação de compostos altamente reativos que podem facilmente formar ligações covalentes com proteínas e DNA (Figura 12.19B). Enquanto essas outras conversões químicas de HCAs são em grande parte alcançadas no fígado, as moléculas reativas resultantes com frequência sobrevivem o suficiente para serem liberadas pelo fígado e passarem através da circulação para outros órgãos nos quais possam exercer sua atividade mutagênica atacando o DNA. (Por exemplo, suspeita-se que aminas heterocíclicas

derivadas do cozimento de carnes vermelhas contribuíam para a alta incidência de câncer de próstata em populações ocidentais.) Juntos, esses vários exemplos, dos quais apenas poucos puderam ser citados, ilustram como as enzimas detoxificantes de nossas células, freqüentemente presentes em grandes concentrações em células do fígado, geram compostos genotóxicos em vez dos produtos finais pretendidos pela evolução – espécies químicas inofensivas, prontamente excretáveis.

A idéia de que mutágenos exógenos e endógenos (o último inclui erros na replicação do DNA, depurinações espontâneas e as ações de espécies químicas endogenamente geradas) constituem causas distintas, separadas, de cânceres humanos, é sugerida pelas análises de mutações pontuais específicas presentes nos alelos mutantes de *p53* carregados por carcinomas de pulmão de fumantes e não-fumantes (veja a Figura 12.17). Transversões G-para-T, por exemplo, nas quais uma base pirimídica (T) substitui uma purina (G), são encontradas em um terço dos alelos mutados de *p53* nos tumores de fumantes. Essa substituição de base está de acordo com as ações mutagênicas dos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, notavelmente o benzo[*a*]pireno (BP), que estão presentes em grandes concentrações na fumaça do cigarro. Essas lesões genéticas são encontradas menos freqüentemente nos alelos mutantes de *p53* em outros tipos de tumores (exceto cânceres de fígado). Além disso, apenas cerca de 21% dos alelos mutantes de *p53* nos tumores de pulmão de não-fumantes apresentam essas transversões, e uma fração significativa dos tumores neste subgrupo podem muito bem ter surgido em fumantes passivos, ou seja, aqueles vivendo com contato próximo a fumantes. O restante dos alelos mutantes de *p53* de tumores de não-fumantes carregam mutações que são mais típicas das alterações espontâneas no DNA descritas na Seção 12.5.

Outra perspectiva, ainda, para a contribuição aparente do benzo[*a*]pireno a cânceres humanos vêm do estudo de carcinomas mamários. Em um estudo, as mulheres que eram ativamente fumantes no momento do diagnóstico do câncer de mama possuíam uma chance mais de 10 vezes maior de carregar transversões G-para-T em seus alelos *p53* associados ao tumor do que as não-fumantes.

Os resultados positivos na identificação de compostos eletrofílicos e agentes alquilantes que são potentes mutágenos e, portanto, carcinógenos levaram ao conceito bastante difundido de que espécies químicas agindo de forma similar que entram no corpo através da comida, água ou ar também são importantes para provocar muitos tipos de cânceres humanos. No entanto, a fração de malignidades humanas que são traçáveis até as ações de carcinógenos mutagênicos específicos em nosso ambiente ou alimentos permanece uma matéria de grande contenção (Seção 11.18). Ademais, é plausível que, à exceção de um pequeno número de mutágenos exógenos, incluindo a radiação UV, produtos da combustão do tabaco, aflatoxina e aminas heterocíclicas, poucos agentes mutagênicos entrem em nossos corpos, criem danos genéticos e, portanto, causem câncer.

12.7 Células movem estrategicamente uma variedade de defesas para proteger moléculas de DNA do ataque por mutágenos

A forma mais efetiva de uma célula proteger seu genoma da disrupção por agentes mutagênicos é protegendo *fisicamente* suas moléculas de DNA do ataque direto. No caso de raios ultravioleta do sol, estes penetram fracamente nos tecidos do corpo, deixando as células da pele e as células pigmentadas da retina como os únicos tecidos vulneráveis. A pele se protege da radiação UV utilizando o pigmento **melanina**, que é doado pelos **melanócitos** aos queratinócitos localizados na região basal da epiderme (a camada epitelial da pele) (Figura 12.20).

A cor da pele em humanos é determinada pela quantidade de melanina que é transferida dos melanócitos para os queratinócitos. O papel dessa pigmentação na patogênese do câncer é demonstrado pelo exemplo freqüentemente citado de casos de câncer de pele na Austrália. Nesse país, um alto fluxo de radiação UV (devido à proximidade ao equador) e uma população fracamente pigmentada (derivada, até recentemente, principalmente das Ilhas Britânicas) foram combinados para criar a maior incidência dessas doenças no mundo. Na África,

por outro lado, as populações humanas com pigmentação mais escura vivendo em latitudes similares raramente experimentam cânceres de pele. (Entre esses poucos que contraem melanomas na África Central, tumores na área não-pigmentada da sola do pé são comuns.) No caso de raios X e radiação cósmica, não há uma proteção física efetiva que possa ser exercida pelo corpo, já que esses tipos de radiação podem penetrar facilmente através de todas as substâncias biológicas.

Essas opções limitadas para a proteção contra carcinógenos físicos contrastam com o grande número de mecanismos dos quais a célula dispõe para interceptar carcinógenos *químicos* antes que eles tenham tido a oportunidade de danificar o genoma celular. Emboscar espécies reativas de oxigênio (ROS) e radicais livres é o trabalho de diversas enzimas, incluindo as enzimas superóxido dismutase e catalase; elas colaboram para detoxificar uma ROS em uma forma não-reativa de oxigênio. As ROS também podem ser interceptadas por uma série de “catadoras” de radicais livres, incluindo vitamina C, α -tocoferol (vitamina E), bilirrubina e urato. Essas moléculas irão reagir quimicamente com as ROS, dessa forma detoxificando-as.

Outra linha de defesa importante, ainda, é erguida por enzimas da classe chamada glutatona-S-transferases (GSTs), que funcionam para ligar compostos eletrofílicos e, portanto, muitos carcinógenos, com a glutatona, dessa forma detoxificando esses compostos e preparando-os para posterior metabolismo e excreção. Por exemplo, um tipo de GST, glutatona-S-transferase- π (GST- π), é utilizada para detoxificar uma vasta gama de carcinógenos (Figura 12.21A,B). Significativamente, até 90% dos adenocarcinomas humanos de próstata mostram uma terminação na expressão de GST- π devido à metilação do promotor do gene *GSTP* (Figura 12.21C) – o mesmo mecanismo que é freqüentemente utilizado por células cancerosas para terminar com a expressão de diversos genes supressores de tumor (Seção 7.8). A inativação freqüente desse gene tem sido reportada também em muitos outros carcinomas humanos. Essa perda da expressão de GST- π , que ocorre relativamente cedo na progressão do tumor, sugere que células pré-malignas de câncer de próstata adquirem uma vantagem de crescimento distinta pela inativação desse gene. Então, sem essa enzima para neutralizar certos carcinógenos, os genomas dessas células epiteliais de próstata são atacados mais freqüentemente por carcinógenos ativamente mutagênicos. A taxa de mutagênese aumentada resultante pode acelerar a marcha para a progressão de tumor.

Uma conexão entre a enzima glutatona S-transferase e a susceptibilidade ao câncer também é sugerida por estudos epidemiológicos. Em um de tais estudos, a configuração alélica de dois genes que codificam GST separados, chamados *GSTT1* e *GSTM1*, foi examinada em uma

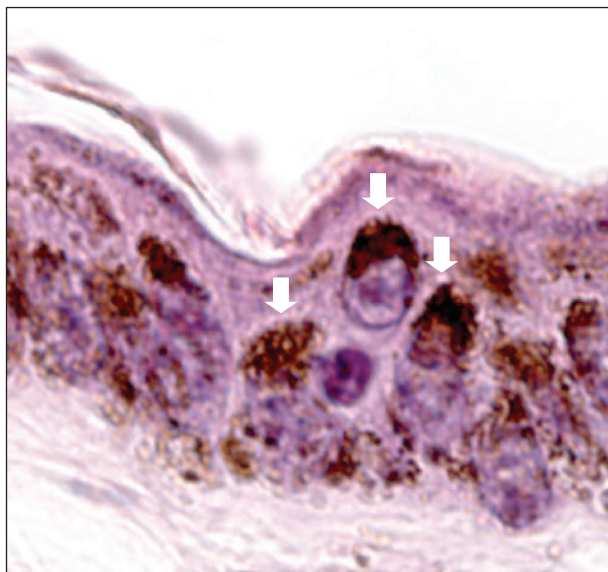


Figura 12.20 Proteção física dos núcleos de queratinócitos contra a radiação UV A principal proteção que queratinócitos da pele possuem da radiação por raios ultravioleta (UV), notavelmente os fótons UV-B, deriva dos melanossomas – vesículas que carregam o pigmento melanina que foi transferido dos melanócitos para os queratinócitos localizados nas camadas basais da epiderme. Como visto aqui, uma vez que os melanossomas são adquiridos pelos queratinócitos, eles são organizados em pequenos guarda-sóis (algumas vezes chamados toucas supranucleares) que se localizam acima dos núcleos dos queratinócitos (setas) e protegem estes núcleos da radiação visível e, mais importantemente, da radiação UV-B. Os núcleos de queratinócitos que não possuem esses guarda-sóis sofrem até quatro vezes mais danos no DNA induzidos por UV do que os núcleos que os possuem. (Cortesia de D. E. Fisher.)

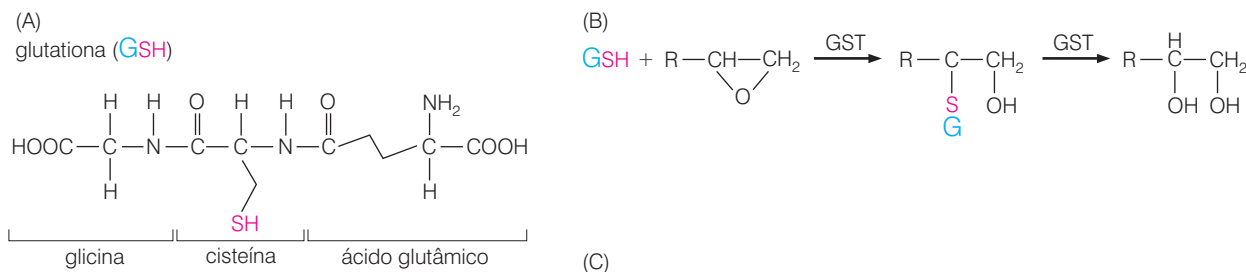


Figura 12.21 Glutationa-S-transferase e sua perda nos tumores (A) A glutatona (GSH) é um tripeptídeo pouco usual no qual o ácido glutâmico está ligado ao grupamento amina da cisteína via carboxila da cadeia lateral do ácido glutâmico. (B) As enzimas glutatona-S-transferase (GST) utilizam o grupo sulfidríla (SH; rosa) do resíduo de cisteína da glutatona para detoxificar diversos compostos reativos antes que eles sejam capazes de reagir com moléculas-alvo na célula, como o DNA. Está mostrada aqui uma reação típica mediada por GST na qual o grupo SH da glutatona é utilizado para romper o grupo epóxido altamente reativo de um composto que sofreu oxidação (em R podem ser vários grupos químicos). (C) Até 90% dos carcinomas de próstata mostram a perda da expressão de uma importante glutatona-S-transferase, a GST- π ; isso priva as células tumorais das formas de detoxificação de muitos mutágenos eletrofilicos. Em muitos desses casos, a perda da expressão de GST- π é traçável por meio da metilação do promotor *GSTP1*. Como pode ser visto aqui, a análise imuno-histoquímica utilizando um anticorpo reativo com GST- π demonstra que em uma lesão de PIN (neoplasia intraepitelial na próstata) pré-maligna – o precursor benigno do câncer de próstata – a presença de GST- π é detectável nas células do epitélio basal (marrom-escuro, lado esquerdo), ao passo que as células epiteliais do lúmen (azul-claro, lado direito) já perderam toda sua expressão de GST- π . A presença de células epiteliais no lúmen é revelada aqui pelo uso de um corante, o DAPI, que é específico para núcleos celulares (azul). (C, de C. Jerônimo, G. Varzim, R. Henrique et al., *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 11:445-450, 2002.)

população normal controle e em indivíduos sofrendo da **síndrome mielodisplásica (MDS)**, uma doença hiperproliferativa da medula óssea que frequentemente progride para leucemia mielogênica aguda (AML). Dos pacientes sofrendo de MDS, 46% carregavam dois alelos nulos (que não codificam enzima alguma) de *GSTT1*; essa condição genética estava presente em apenas 16% da população geral utilizada como controle. (No caso do gene relacionado *GSTM1*, a homozigose do alelo nulo foi encontrada em proporções comparáveis nas duas populações.) Cálculos indicaram que indivíduos herdando os dois alelos nulos do gene *GSTT1* estão sujeitos a um risco quatro vezes maior de desenvolverem a síndrome mielodisplásica do que aqueles que carregam ao menos um alelo funcional do gene. Tais observações sugeriram que a isoenzima T1 da glutatona está envolvida de alguma forma na detoxificação de compostos que provocam MDS. (Uma interpretação alternativa, que é menos provável, porém difícil de ser excluída até o presente momento, é que o gene *GSTT1* é proximamente relacionado, no cromossomo, a um segundo gene que predispõe um indivíduo a MDS.) Outros estudos epidemiológicos apontaram para conexões entre o metabolismo de carcinógenos e risco individual de câncer (Barra lateral 12.5).

Além disso, essas defesas químicas elaboradas contra mutágenos que estão atacando falham na proteção do genoma com alguma frequência. A taxa de falha depende da natureza química do mutágeno que está atacando e dos níveis das moléculas recrutadas pelas células para interceptar esses atacantes. Como consequência, bases alteradas são de fato criadas em números substanciais todos os dias na vida de uma célula.

Essas discussões sobre a ativação de carcinógenos levam inevitavelmente a outra questão: se muitas das enzimas ativadoras (como os citocromos) são desenhadas pela natureza

Barra lateral 12.5 Diferenças interindividuais na ativação de carcinógenos parecem contribuir para o risco de câncer e responsividade à terapia. As células utilizam um amplo espectro de enzimas para modificar carcinógenos em potencial de diversas formas químicas, incluindo a ligação de grupos acetil, ácido glucurônico, glutatona e sulfato; muitas dessas modificações químicas auxiliam na detoxificação e eventual excreção de compostos potencialmente tóxicos, incluindo mutágenos. Devido à heterogeneidade genética do conjunto de genes humanos, o nível de expressão de muitas das enzimas responsáveis por essas reações de detoxificação pode variar muito entre diferentes indivíduos. Essas diferenças podem, por sua vez, influenciar fortemente as respostas biológicas de um indivíduo a carcinógenos em potencial. Por exemplo, um estudo de 416 pacientes com câncer de pulmão e 446 pacientes saudáveis controle determinou que indivíduos de um certo genótipo possuíam um risco duas vezes aumentado de câncer de pulmão. Esses indivíduos suscetíveis carregavam um alelo particular do gene *Cyp1A1*, que codifica um citocromo, e alelos nulos dos genes especificando a glutatona-S-transferase M1 (*GSTM1*).

Outro estudo focado em adenomas de mama foi realizado com mulheres que consumiam mais do que 27 ng por dia de certa amina heterocíclica (2-amino-3,8-dimetilimidazo[4,5-f] quinoxalina – MeIQx; veja a Figura 12.19A) que estava presente em sua dieta, aparentemente do consumo de grandes quantidades de carne assada. Mulheres que expressavam altos níveis de *N*-acetiltransferase 1 (NAT1, uma enzima que pode auxiliar na conversão de aminas heterocíclicas em mutágenos ativos) foram reportadas por apresentarem um aumento de seis vezes nas taxas de adenomas, enquanto aquelas com níveis muito mais baixos de NAT1 apresentaram um risco aumentado apenas duas vezes. Em ambos os casos, a frequên-

cia de adenomas foi comparada com a incidência de adenomas em um terceiro grupo de mulheres que tinham baixos níveis de MeIQx em suas dietas. Essas correlações sugerem que enzimas podem influenciar a incidência de câncer de duas maneiras: algumas enzimas afetam a taxa na qual diversos compostos potencialmente mutagênicos são detoxificados, enquanto outras convertem (inadvertidamente) compostos não-reativos em mutágenos quimicamente reativos.

Na verdade, essas enzimas possuem uma intersecção com a doença do câncer ainda de outra forma, já que elas também atuam para detoxificar drogas quimioterapêuticas, dessa forma diminuindo os efeitos do tratamento. Um efeito particularmente dramático dessas enzimas no sucesso de uma terapia de câncer foi observado ao examinar as respostas clínicas de pacientes com câncer de mama que carregavam alelos funcionais dos genes *GSTM1* e *GSTT1*; as respostas destes foram comparadas com aquelas de um grupo de mulheres que possuíam alelos nulos de ambos os locos genéticos. Todas essas mulheres foram tratadas com um regime quimioterápico combinado (envolvendo ciclofosfamida, Adriamicina e 5-fluorouracil) mais radiação. Das mulheres que possuíam alelos funcionais de *GSTM1* e *GSTT1*, quase todas sucumbiram à doença dentro de seis semanas de tratamento. Por outro lado, das mulheres duplamente nulas para ambos os locos, em torno de dois terços ainda estavam vivas após oito semanas de tratamento.

Em todos os casos citados nesta Barra lateral, essas respostas diferenciais foram correlacionadas a alelos específicos. É importante lembrar, no entanto, que essas são apenas correlações, e não relações de causalidade. Em cada caso, é possível, a princípio, que os alelos sendo estudados fossem proximamente relacionados a ainda outros alelos que seriam as causas verdadeiras do aumento ou diminuição de resposta observada nos pacientes.

para neutralizar e detoxificar xenobióticos, quais são as origens e ônus diário desses compostos que nossos diversos tecidos devem rotineiramente deter? E, entre esses xenobióticos, carcinógenos produzidos pelo homem contribuem substancialmente para tal ônus (Barra lateral 12.6)?

12.8 Enzimas de reparo consertam o DNA que foi alterado por mutágenos

Se compostos genotóxicos não são interceptados antes que ataquem o DNA, células de mamífero possuem uma estratégia reserva para minimizar os danos genéticos causados por esses carcinógenos em potencial. Um sistema elaborado de reparo de DNA existe para monitorar a integridade do genoma, para remover bases inapropriadas criadas por ataques químicos e físicos e também para substituí-las por outras bases que existiam antes do ataque. Componentes desse sistema também atuam para manter unidas as dupla hélices que foram quebradas por agentes genotóxicos ou acidentalmente durante a replicação. Parece provável que uma célula de mamífero possua muitas centenas de proteínas distintas para assegurar que o dano ao DNA seja improvável de resultar em uma mutação sendo transmitida para células-filhas. Algumas dessas proteínas de reparo de DNA possuem grande papel no processo da carcinogênese humana, já que defeitos nessas proteínas resultam em taxas aumentadas de mutação, dessa forma acelerando a taxa de progressão de tumor.

As células apresentam uma grande variedade de enzimas para completar a desafiadora tarefa de restaurar a estrutura normal do DNA. De maneira importante, essas funções são diferentes das das enzimas de reparo de pareamento errôneo (MMR) descritas anteriormente (Seção

Barra lateral 12.6 Mutágenos xenobióticos feitos pelo homem podem algum dia causar câncer? O debate inflamado sobre os carcinógenos feitos pelo homem no ar e na cadeia alimentar humana – especificamente os produtos da química orgânica sintética – continua inabalável por meio século. Muito desse debate está focado nos contaminantes residuais na cadeia alimentar, notavelmente os pesticidas, e na possibilidade de que eles possam tornar-se metabolicamente ativados em potentes mutágenos e, então, em carcinógenos, uma vez que tenham entrado em nossos corpos. Bruce Ames, do teste de Ames, estimou que, ingerindo alimentos que ocorrem naturalmente, os humanos estão expostos a uma base diária de entre 5 mil a 10 mil compostos químicos naturais distintos e seus produtos de quebra metabólica. Incluídos entre esses, estão cerca de 2.000 mg de material queimado (os produtos do cozimento de diversos alimentos em altas temperaturas) e 1.500 mg de pesticidas que ocorrem naturalmente (utilizados por plantas para se protegerem de insetos predadores). Em contraste, a exposição média diária a todos os resíduos de pesticidas sintéticos contaminando a cadeia alimentar chega a 0,1 mg. Cerca de metade dos pesticidas de plantas que ocor-

rem naturalmente foram descobertos como carcinogênicos quando testados em roedores de laboratório utilizando protocolos-padrão de teste. Já que (1) pesticidas sintéticos são tão prováveis de serem registrados como carcinógenos em testes com roedores quanto compostos de origem natural (i. e., plantas) escolhidos aleatoriamente; já que (2) compostos derivados de plantas, como aqueles dos vegetais que comemos, são geralmente presumidos como saudáveis; e já que (3) as concentrações de poluentes sintéticos na cadeia alimentar são muitas ordens de magnitude menores do que os compostos naturais (e equivalentemente carcinogênicos) de plantas, isso levanta a questão de se os pesticidas sintéticos já foram responsáveis por números significativos de cânceres humanos nas populações ocidentais. Pode ser possível que o papel de espécies químicas sintéticas na criação de cânceres humanos (com a exceção de produtos da combustão do tabaco e dos produtos do cozimento de alimentos a altas temperaturas) esteja muito limitado aos compostos que são encontrados repetidamente e em concentrações muito altas em certas ocupações, como em agricultores que lidam com grandes quantidades de pesticidas rotineiramente.

12.4), pois as enzimas MMR são muito focadas na detecção de nucleotídeos na estrutura normal que foram incorporados nas posições erradas, ao passo que os mecanismos de reparo discutidos aqui detectam nucleotídeos de estrutura química anormal.

A estratégia mais simples para restaurar a estrutura do DNA quimicamente alterado envolve uma reversão da reação química catalisada pela enzima que inicialmente criou a base alterada. Por exemplo, um tipo de DNA alquiltransferase remove adutos metil e etil da posição O⁶ da guanina, dessa forma restaurando a estrutura da base normal (Figura 12.22A e B). A importância desta enzima (O⁶-metilguanina DNA metiltransferase [MGMT], freqüentemente referida apenas como DNA alquiltransferase) no desenvolvimento de certos tipos de tumores humanos é sugerida pelas observações de que o gene *MGMT* é silenciado pela metilação do promotor em até 40% dos gliomas e tumores colorretais, e em até 25% dos carcinomas de células não-pequenas, dos linfomas e dos carcinomas de cabeça e pescoço. (Em contraste, a metilação do seu promotor não é detectada em muitos outros tipos de tumor.) Como era o caso dos genes detoxificantes, como os alelos da glutathione-S-transferase (*GST*) discutidos anteriormente, podemos imaginar que a perda dessa função de reparo do DNA em certos tecidos favoreça taxas aumentadas de mutação e, portanto, acelere a progressão de tumor. (Por outro lado, quando o gene *MGMT*, na forma de um transgene, é superexpresso na glândula mamária ou no timo de camundongo, tal expressão torna essas glândulas bastante resistentes a outros efeitos, em outras circunstâncias potencialmente carcinogênicos, da metilnitrosouréia, um mutágeno alquilante largamente utilizado; veja, por exemplo, a Figura 12.22C.)

Provocativamente, em certos modelos animais de câncer, e muito possivelmente em humanos, os *tipos* de tumor causados por certos carcinógenos podem ser influenciados pelos tipos específicos de enzimas de reparo de DNA que foram empregadas em diversos tecidos (Barra lateral 12.7). Além disso, como era o caso da enzima glutathione-S-transferase (Barra lateral 12.5), essas enzimas de reparo de DNA podem influenciar as respostas à terapia. Em uma ocasião, após um grupo de pacientes com glioblastoma expressando níveis altos da enzima MGMT serem tratados com um agente quimioterapêutico alquilante, eles sobreviveram por outros 12 meses; outros pacientes na mesma situação cujas células expressavam apenas níveis baixos de MGMT, sobreviveram 22 meses após a terapia – quase o dobro do tempo. Isso sugere que altos níveis da enzima MGMT são muito efetivos na remoção de grupos alquil criados pelo agente quimioterápico, dessa forma neutralizando seus efeitos.

O sistema MGMT descrito anteriormente é a única forma pela qual as células lidam com bases metiladas. Outros, envolvendo homólogos da proteína de reparo de DNA bacteriano AlkB, atuam oxidando grupos metil que se tornaram ligados a bases, que são então perdidos como formaldeído dos anéis de todas as quatro bases do DNA; de forma similar, as enzimas AlkB fazem com que o grupo etil maior seja liberado como acetaldeído. (Aficionados por reparo de DNA retratam essas enzimas como “explodindo” os grupos metil indesejados!). Conforme mencionado anteriormente, a metilação de bases de DNA pode ocorrer com frequência durante a vida de células por meio das ações de S-adenosilmetionina, o doador de metil que participa da biossíntese de muitas moléculas na célula; seu grupo metil altamente reativo pode acidentalmente tornar-se desviado para metilar diversas macromoléculas celulares, incluindo as bases do DNA.

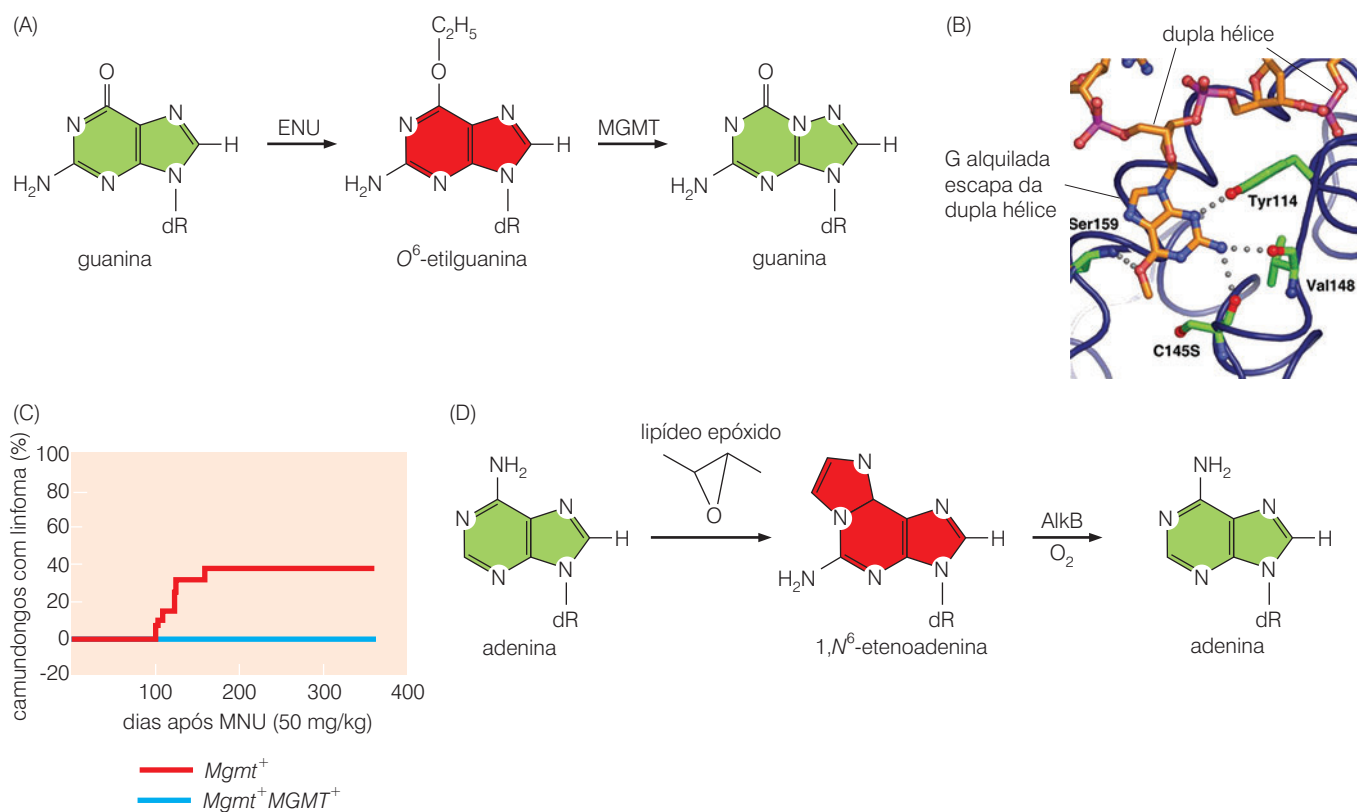


Figura 12.22 Restauração da estrutura normal de bases por enzimas de reparo desalquiladoras (A) A posição O⁶ da guanosina é especialmente vulnerável a alquilação por agentes como a etilnitrosouréia (ENU). Ao contrário de muitas enzimas de reparo de DNA, que respondem a bases alteradas excisando-as do DNA, a enzima O⁶-metilguanina-DNA metiltransferase (MGMT; também conhecida como O⁶-alquilguanina DNA alquiltransferase [AGT]) restaura uma guanosina alterada a sua estrutura normal. Ela o faz removendo o grupo alquil do átomo O⁶ da guanina. Na ausência de tal reparo, a guanosina alquilada leva frequentemente a uma mutação de transição G-para-A. (B) Análises estruturais das proteínas de reparo de DNA revelaram muito sobre como elas funcionam. No caso da proteína MGMT, essas análises, juntamente com estudos de enzimologia, indicaram que essa enzima (*abaixo, azul-claro e escuro*) age deslocando a base danificada (*azul, laranja*) para fora da dupla hélice (*acima, laranja e púrpura-claro*) antes da remoção do grupo alquil. Além disso, a reação entre a enzima e seu substrato é estequiométrica, na medida em que o resíduo de cisteína 145 (C145) (*vermelho, verde, abaixo*) no sítio ativo torna-se irreversivelmente alquilado após a

restauração da estrutura normal da guanosina; assim, cada molécula de enzima é capaz de desalquilar apenas uma única desoxiguanosina alquilada. (C) Os efeitos da expressão ectópica de MGMT são vistos aqui em camundongos que foram expostos ao carcinógeno alquilante metilnitrosouréia (MNU). Camundongos tipo selvagem (Mgmt⁺) são altamente suscetíveis à indução de linfomas no timo (*linha vermelha*), ao passo que camundongos transgênicos que superexpressam a enzima MGMT devido a um transgene em sua linhagem germinativa (Mgmt⁺MGMT⁺, *curva azul*) são bastante protegidos desses efeitos. (D) Peroxídeos de lipídeos altamente reativos, que são comuns em tecidos inflamados, podem atacar e modificar adenina (*mostrado aqui*), bem como outras bases do DNA (*não-mostrado*). A enzima AlkB de bactéria pode remover o aduto resultante bem como adutos metilados mais simples, como aqueles mostrados na Figura 12.14C; homólogos de AlkB são assumidos como agindo semelhantemente em células de humanos. (A, de S.L. Gerson, *Nat. Rev. Cancer* 4:296:307, 2004; B, de D.S. Daniels, T.T. Woo, K.X. Loo et al., *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11:714-720, 2004; C, de L.L. Dumenco, E. Allay, K. Norton e S.L. Gerson, *Science* 259:219-222, 1993.)

Barra lateral 12.7 Padrões de expressão das enzimas de reparo explicam certas suscetibilidades tecido específicas ao câncer

Células de mamífero parecem expressar apenas uma única enzima MGMT. A importância desta atividade em influenciar a carcinogênese é indicada pelos experimentos nos quais ratas grávidas são expostas ao carcinógeno N-etilnitrosouréia (ENU) durante a 15ª semana de gestação. Virtualmente todos os filhotes de rato que nascem sucumbem a tumores neuroectodermais surgindo no sistema nervoso central alguns meses após o nascimento. A capacidade peculiar de ENU de induzir preferencialmente estes tumores pode ser explicada pelo fato de que a enzima MGMT é expressa em níveis significantes em todo o corpo de embriões em desenvolvimento e recém nascidos, sendo, porém, minimamente expressa no sistema nervoso central. Consequentemente, resíduos alquilados de guanina que são formados nas células do sistema nervoso central persistem, ao invés de serem rapidamente removidos e são capazes de gerar mutações pontuais que são responsáveis pela criação de oncogenes nos tumores resultantes. Em um experimento conduzido com ratos recém nascidos que haviam sido expostos a ENU ou ao agente alquilante relacionado MNU (*N*-metilnitrosouréia), os níveis de adutos de O⁶-alquilguanina sobrevivendo de forma não reparada formados uma semana após a exposição a estes carcinógenos eram 20 vezes (ENU) e 90 vezes (MNU) maiores no DNA cerebral do que no do fígado.

A AlkB bacteriana (e muito possivelmente seus homólogos de mamífero) também foi descoberta como capaz de remover adutos mais complexos de bases. Por exemplo, a oxidação inadvertida de lipídeos insaturados, originando peroxilipídeos, ocorre a taxas elevadas em tecidos inflamados; esses peróxidos altamente reativos podem gerar adutos complexos com bases de DNA (Figura 12.22D) que são altamente mutagênicos. De fato, tais adutos foram descobertos em tecidos de pacientes com colite ulcerativa, que sabidamente progridem, com alguma frequência, a carcinomas (veja a Barra lateral 11.13). Um papel na patogênese do câncer em humanos dos homólogos de AlkB, chamados hABH2 e hABH3, ainda não foi demonstrado diretamente.

Muito mais importante, no entanto, do que essas enzimas desalquiladoras são as numerosas enzimas celulares que reconhecem bases quimicamente alteradas no DNA e respondem de duas outras formas, dependendo da modificação específica do DNA. Em alguns casos, enzimas especializadas irão clivar a ligação unindo uma base modificada ao açúcar desoxirribose, o processo conhecido como **reparo por excisão de bases** (BER; Figura 12.23A). Em outros casos, o nucleotídeo inteiro contendo tanto a base quanto a desoxirribose associada será cortado fora, processo denominado **reparo por excisão de nucleotídeo** (NER; Figura 12.23B).

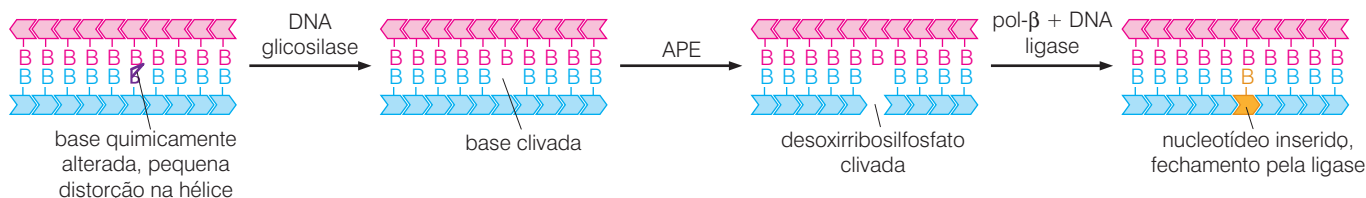
O BER tende a reparar lesões no DNA que derivam de fontes endógenas, como aquelas atribuídas a espécies reativas de oxigênio e eventos de depuração descritos anteriormente (Seção 12.5). O NER, por outro lado, foca suas energias grandemente no reparo de lesões criadas por agentes exógenos, como fótons de UV e carcinógenos químicos (p. ex., veja a Figura 12.16 e 12.18). BER parece se concentrar em reparar lesões que não criaram distorções estruturais na dupla hélice do DNA, ao passo que NER direciona sua atenção a alterações que distorcem a hélice.

BER é iniciado por um grupo de **glicosilases** do DNA, cada uma especializada no reconhecimento de uma base anormal e na clivagem de sua ligação covalente à desoxirribose. Por exemplo, uma base uracila no DNA é prontamente reconhecida pelas proteínas responsáveis por BER, já que o U não está normalmente presente no DNA. U é removida pela enzima uracil DNA-glicosilase e logo substituída, em geral, por uma C. (Referir-se à Figura 12.11B para ver como uracila pode surgir no DNA por meio da desaminação espontânea da citosina.) No entanto, a presença de uma timina inapropriadamente localizada no DNA representa um desafio para essas enzimas de reparo, pois T é um constituinte normal do DNA. Como já lemos, 5-metil-C ocasionalmente sofre desaminação espontânea levando a T e, portanto, pares de base TG (veja a Figura 12.11B). De fato, a evolução respondeu a esse problema implantando uma T:G glicosilase em nossas células, a qual é designada especificamente para excisar Ts que surgiram opostamente a Gs. Não obstante, está claro que os pares de base T:G formados por essa desaminação ocasionalmente escapam da detecção por essa enzima e persistem a originar mutações pontuais.

Após a remoção de uma base aberrante por uma DNA glicosilase, o açúcar livre de base resultante é então clivado por uma segunda enzima, uma endonuclease chamada APE (endonuclease apurínica/apirimídica) que é especializada em cortar a fita carregando a desoxirribose livre de base, fazendo isso na extremidade 5' do açúcar; uma segunda enzima, chamada uma AP liase, então cliva a porção 3', liberando esta base desprovida de açúcar. A falha simples resultante no DNA é reparada por uma DNA polimerase, frequentemente a polimerase β . A quebra fita simples resultante é finalmente fechada por uma DNA **ligase**, que une novamente nucleotídeos adjacentes por meio da formação de ligações fosfodiéster entre elas, reconstruindo, dessa forma, a estrutura química normal do DNA. (Uma forma variante, ocasionalmente utilizada, de BER, chamada “reparo de longo alcance” envolve a excisão de 4 a 7 nucleotídeos ao redor da base danificada seguida por um preenchimento do vão resultante.)

O reparo por excisão de nucleotídeo (NER; veja a Figura 12.23B) é realizado por um grande complexo multiprotéico composto de quase duas dúzias de subunidades. Esse complexo parece necessitar de duas mudanças distintas no DNA antes que inicie seu reparo: a distorção significativa da estrutura Watson-Crick normal da dupla hélice mais a presença de uma base

(A) reparo por excisão de bases (BER)



(B) reparo por excisão de nucleotídeo

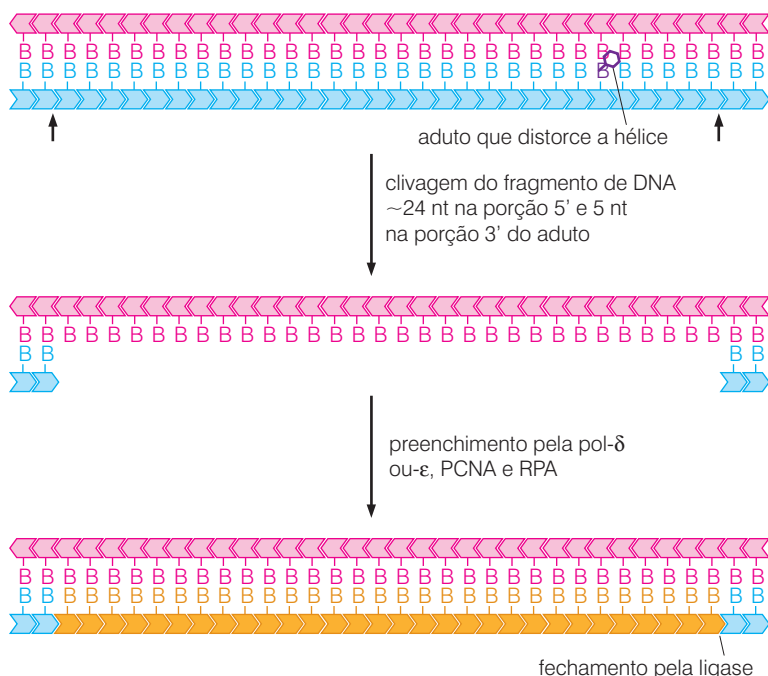


Figura 12.23 reparo por excisão de bases e nucleotídeos (A) O reparo por excisão de bases (BER) é alcançado por enzimas que reconhecem bases quimicamente alteradas que possuem mínimo efeito de distorção na hélice. Essas enzimas DNA glicosilases clivam a ligação glicosil unindo a base alterada (*púrpura*) e a desoxirribose. A desoxirribosilfosfato livre de base é então excisada por uma enzima – a endonuclease apurínica/apirimídica (APE) – especializada na remoção de açúcares livres de bases. Essa falha de um único nucleotídeo é então preenchida pela DNA polimerase β e fechada por uma DNA ligase. (B) O reparo por excisão de nucleotídeo (NER) é alcançado por enzimas que reconhecem lesões volumosas, que distorcem a hélice e clivam as seqüências flanqueadoras de oligonucleotídeos em locais de aproximadamente 24 nucleotídeos (nt) na porção 5' e em torno de 5 nucleotídeos na porção 3'. O vão fita simples resultante de cerca de 29 nt é então preenchido pela DNA polimerase δ ou ε, agindo juntamente com um PCNA (antígeno nuclear de célula proliferativa), e finalmente é fechado por uma DNA ligase. As “bandeirinhas” representam nucleotídeos de desoxirribose; em todos os casos, elas estão apontando para a direção 5'-para-3'.

quimicamente alterada. Uma vez que esse grande complexo reconhece o problema, ele prossegue para clivar a fita danificada *upstream* e *downstream* do dano, originando um fragmento fita simples de 25 a 30 nucleotídeos de tamanho, que é então removido. As DNA polimerases que são especializadas em preencher o espaço resultante no DNA (utilizando a fita complementar, não danificada como molde) assumem a partir de então, seguidas pela DNA ligase, que apaga o traço final do dano.

Incluídas entre as enzimas NER estão aquelas que são capazes de reconhecer e remover estruturas resultantes da formação de adutos de base volumosos (i. e., aqueles compostos de estruturas moleculares complexas ligadas covalentemente a bases) criadas por certos mutágenos exógenos, como hidrocarbonetos policíclicos, aminas heterocíclicas, aflatoxina B1, bem como os dímeros de pirimidina formados por radiação UV. Por exemplo, após a exposição a radiação UV, células de humanos em cultura podem reparar cerca de 80% dos dímeros de pirimidina em 24 horas. O aparato ativo NER removerá cinco nucleotídeos na porção 3' do fotoproduto (o dímero de pirimidina) e 24 nucleotídeos na porção 5'.

As várias reações que constituem NER podem verdadeiramente ser divididas em dois subtipos. O primeiro destes está focado especificamente na fita molde de genes ativamente transcritos e está acoplada às ações de moléculas de RNA polimerase que estão seguindo as fitas molde durante a transcrição; essas ações são chamadas reparo acoplado à transcrição (TCR). O segundo subtipo de NER diz respeito ao restante do genoma, incluindo a fita não-molde dos genes transcritos, bem como as regiões não-transcritas do genoma. Esse tipo de NER é algumas vezes denominado reparo genômico global (GGR). A proteína supressora de tumor

p53 ativa a expressão de muitos genes codificando proteínas NER envolvidas em GGR (Tabela 9.2), explicando a imperfeição de GGR em células mutantes de *p53*; em contraste, o reparo acoplado à transcrição está intacto nessas células. Essa distinção entre TCR e GGR estabelece implicações profundas para a manutenção de genomas celulares na metade de todos os tumores humanos nos quais o gene *p53* é mutante (Capítulo 9). Muitos dos cânceres restantes, nos quais a função de p53 está comprometida de outras formas, também podem possuir defeitos no reparo genômico global.

Uma estratégia alternativa da célula para lidar com DNA danificado – na verdade, um ato de desespero – envolve a replicação do DNA de um pedaço ainda não reparado da fita molde de DNA. Isso é denominado replicação de DNA *predisposta a erro*, já que o aparato de replicação envolvido aqui deve freqüentemente “adivinhar” qual dos quatro nucleotídeos é apropriado para a incorporação na fita de DNA nascente quando ele encontra uma base ou bases ainda danificadas; essas suposições não estão sempre corretas, levando muito freqüentemente a bases erroneamente incorporadas (Figura 12.24).

Até a data, no mínimo nove DNA polimerases de mamíferos distintas predispostas a erro já foram descobertas. Algumas dessas podem adicionar nucleotídeos a uma fita nascente mesmo quando uma base na fita complementar está faltando. Outras podem estender uma fita nascente de DNA, utilizando como iniciador um nucleotídeo que foi erroneamente incorporado por outra DNA polimerase. Um terceiro tipo pode incorporar uma base quando a base correspondente na fita complementar carrega um aduto de DNA volumoso, ligado covalentemente, que ainda não foi removido pelo reparo por excisão de nucleotídeos. Uma dessas enzimas, codificada pelo gene *XPV*, é altamente especializada, sendo capaz de reconhecer os dímeros T-T de timina criados pela radiação UV e inserir dois As na fita oposta (veja a Figura 12.24). Enquanto as DNA polimerases responsáveis pela síntese da maior parte de DNA possuem uma taxa de erro tão pequena quanto 10^{-5} , essas polimerases predispostas a erro geralmente possuem taxas de erro de até uma base erroneamente incorporada para cada 100 bases replicadas.

Os erros cometidos pelas polimerases predispostas a erro poderiam parecer gerar taxas de mutação inaceitavelmente altas nos genomas celulares. Ainda, o preço pago pela acumulação de tais mutações deveria ser contrabalanceado pela alternativa: o risco de morte iminente confrontada por uma célula cuja forquilha de replicação de DNA estivesse confinada devido a lesões difíceis de serem copiadas em seu DNA.

Talvez a melhor estudada dessas polimerases predispostas a erro seja a DNA polimerase β (pol- β), que em geral está envolvida na substituição de nucleotídeos que foram removidos devido a BER. Essa molécula relativamente pequena de polimerase não possui as capacidades de correção das maiores enzimas polimerases (Seção 12.4), e tal ausência pode explicar muitas dessas atividades predispostas a erro da replicação de DNA. Em uma grande variedade de linhagens celulares de carcinoma de ovário, essa enzima foi descoberta como superexpressa por um fator tão grande quando 10. A superexpressão da DNA polimerase β predisposta a erro pode representar uma estratégia efetiva utilizada por essas células cancerosas para aumentar a mutabilidade de seus genes e, assim, acelerar a taxa de progressão de tumor. Para embasar tal idéia, a superexpressão forçada da polimerase β em fibroblastos humanos em cultura foi descoberta por encorajar a instabilidade de microsatélites e aumentar as taxas gerais de mutação em até três vezes.

Figura 12.24 Reparo predisposto a erro A síntese de DNA propensa a erro ocorre quando a forquilha de replicação está avançando durante a replicação e encontra uma lesão ainda não reparada no DNA, tal como o dímero de timidina mostrado aqui. Na grande maioria dos casos (*esquerda*), a DNA polimerase propensa a erro (algumas vezes chamada *polimerase bypass*) que é convocada e utilizada para responder a essa lesão na fita molde danificada (*vermelho*) e inserir as bases apropriadas (neste caso, um dinucleotídeo A-A) na fita nascente de DNA (*verde-escuro*). Por outro lado, em uma grande percentagem desses encontros (*direita*), a polimerase propensa a erro irá falhar ao “adivinhar” corretamente a estrutura da lesão na fita molde e irá, em vez disso, incorporar um dinucleotídeo G-G opostamente ao dímero de timidina.

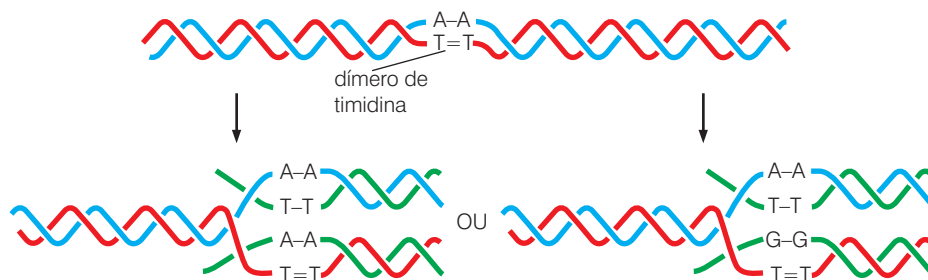


Figura 12.25 Um paciente com xeroderma pigmentoso Um paciente sofrendo de xeroderma pigmentoso (XP) possui lesões graves em todas as áreas da pele expostas ao sol. Essas lesões podem se desenvolver em carcinomas de células escamosas e basais, bem como em melanomas. Os tumores se desenvolvem a taxas que são até mil vezes maiores do que as da população em geral. (Cortesia de K.H Kraemer.)



A utilização de polimerases predispostas a erro pela célula representa uma situação na qual tal célula está fazendo o melhor de uma situação desesperada: ela aposta que bases incorretamente incorporadas são um risco aceitável para evitar a morte que iria inevitavelmente ocorrer de uma falha completa na replicação do DNA. Na verdade, existe no mínimo uma enzima codificada no genoma de mamíferos que insere mutações *propositamente* no genoma. Tal enzima pode, também, de forma inadvertida, contribuir para o desenvolvimento de câncer.

12.9 Defeitos herdados no reparo por excisão de nucleotídeos, no reparo por excisão de bases e no reparo de pareamento errôneo levam a síndromes específicas de suscetibilidade a câncer

Em 1874, dois médicos austro-húngaros, Ferdinand Hebra e Moritz Kaposi, descreveram uma síndrome pouco usual que envolvia altas taxas de desenvolvimento de carcinomas em células escamosas e basais da pele. (Kaposi subsequentemente descreveu o sarcoma pouco usual que recebeu seu nome.) Como se tornou aparente depois, indivíduos afetados possuem extrema sensibilidade à radiação UV, e crianças irão frequentemente sofrer queimaduras graves na pele após uma exposição mínima à luz do sol. Esses indivíduos apresentam a pele seca, semelhante a de ovelhas e bodes (xeroderma) e muitas sardas ("pigmentoso"; Figura 12.25). Em conjunto, indivíduos sofrendo da síndrome *xeroderma pigmentosum* (XP) possuem um risco mil vezes aumentado de desenvolver câncer de pele se comparados com a população em geral e em torno de 100 mil vezes de risco aumentado de carcinoma de células escamosas na ponta da língua. Cânceres de pele aparecem em crianças com uma idade média de oito anos, comparados com os 50 antes de tais cânceres serem encontrados na população em geral (Figura 12.26).

Defeitos herdados em qualquer um de oito genes distintos podem levar a xeroderma pigmentoso. A complexidade genética dessa síndrome foi primeiramente reconhecida por meio do uso da genética de células somáticas. Células de dois pacientes diferentes com XP foram fusionadas em cultura para determinar o fenótipo de reparo das células híbridas resultantes (Figura 12.27). Em muitas ocasiões, os híbridos foram identificados como reparando normalmente o DNA, indicando que duas células parentais carregavam defeitos no reparo de DNA que foram associados a dois genes distintos. Por exemplo, utilizando uma nomenclatura desenvolvida posteriormente, células de um indivíduo possuidor de um gene *XP*A mutante (e

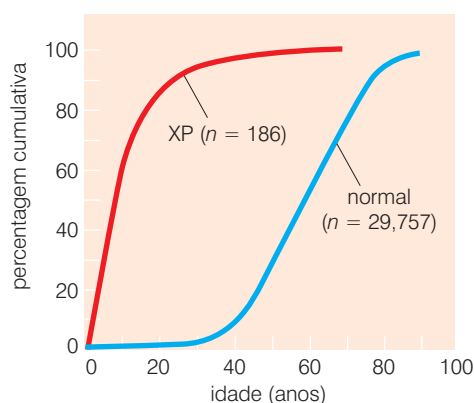


Figura 12.26 Epidemiologia dos pacientes com XP Pacientes sofrendo de xeroderma pigmentoso (XP) exibem cânceres de pele muito mais cedo do que a população em geral (*normal*). Na população em geral, esses cânceres de pele aparecem com uma idade média de início de aproximadamente 60 anos, em contraste à população com XP, na qual os cânceres são diagnosticados em uma idade média de 10 anos. As percentagens na ordenada são calculadas pela divisão do número de pacientes que já foram diagnosticados com um ou mais cânceres de pele com uma dada idade pelo total do número de pacientes nessa população que irá eventualmente ser diagnosticada com tais cânceres. Assim, na população com XP, virtualmente todos que irão desenvolver cânceres de pele já o fizeram por volta dos 25 anos. *n* representa o número de indivíduos em cada população estudada. (De J.E. Clever and K.H. Kraemer, in C.R. Scriver et al (eds.), *The Metabolic Basis of Inherited Disease*, 6th ed. New York: McGraw-Hill, 1989, pp. 2949-2971.)

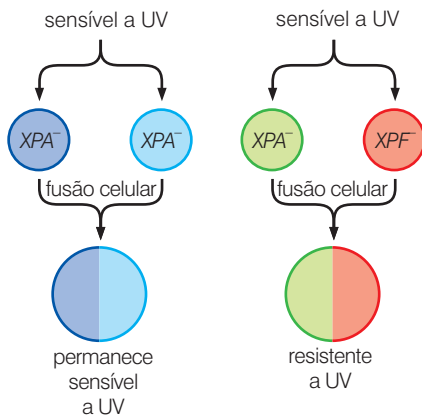


Figura 12.27 Descoberta de grupos de complementação de XP. Experimentos de fusão celular utilizando células de cultura de pacientes com xeroderma pigmentoso (XP) revelaram que certas combinações de fibroblastos, cada qual derivado de um paciente diferente (*azul-escuro*, *azul-claro*, *esquerda*), quando fusionados, originaram células tetraplóides híbridas que são tão sensíveis a UV quanto as populações parentais. Em outras ocasiões, porém (*direita*), combinações de células de dois pacientes (*verde-claro*, *vermelho-claro*) originaram células híbridas após a fusão celular que são resistentes à morte mediada por UV, assim como as células de indivíduos normais. Tais descobertas fizeram com que o par de células que não complementou o defeito de reparo de DNA da outra (*azul-escuro*, *azul-claro*) fosse assinalado para o *mesmo* grupo de complementação, ostensivamente porque as duas populações carregavam mutações no mesmo gene. Por outro lado, o sucesso na complementação de outros pares de células (*verde-claro*, *vermelho-claro*), fez com que os tipos celulares parentais respectivos fossem assinalados a dois grupos de complementação distintos, indicando que os alelos mutantes e ao menos dois genes estavam envolvidos na predisposição à XP. Assim, oito grupos distintos de complementação foram eventualmente delineados. Anos após, os genes respectivos, cada um representado por um grupo de complementação, foram isolados por clonagem gênica.

possuidor de um gene *XPC* tipo selvagem) eram capazes de reparar o DNA normalmente após serem fusionados a células de indivíduos que possuíam um gene mutante *XPC* (e possuindo um gene tipo selvagem *XPA*). Tal colaboração, ou “**complementação genética**”, levou à classificação de alelos mutantes associados à XP em oito grupos distintos de complementação, cada um ostensivamente definido pela identidade de um gene responsável. Apenas anos depois os genes responsáveis foram isolados por clonagem molecular. Quase sempre foi possível mostrar que um indivíduo afetado havia herdado dois alelos mutantes, nulos, de um gene representando um ou outro grupo de complementação de XP.

Sete dos oito genes associados à XP, chamados *XPA* até *XPG*, codificam proteínas que atuam como componentes no grande complexo multiprotéico de reparo por excisão de nucleotídeos (NER). O oitavo gene, *XPV*, especifica a DNA polimerase predisposta a erro pol- η , da qual muitas células parecem fazer uso quando suas DNA polimerases usuais (p. ex., a pol- δ) são incapazes de copiar sobre lesões não-reparadas no DNA, tais como os dímeros de pirimidina. Conforme mencionado na seção anterior, as polimerases predispostas a erro (algumas vezes denominadas **polimerases *bypass***) são capazes de copiar uma fita molde de DNA contendo dímeros ainda não reparados de T-T, geralmente sintetizando dois As na fita complementar. Em geral, a pol- η é calculada como tão específica que ela incorpora nucleotídeos AA na fita nascente de DNA oposta a dímeros de TT 95% das vezes.

Indivíduos afetados por XP também possuem algum risco aumentado de outras doenças, notavelmente problemas neurológicos, que são observados em cerca de 18% desses pacientes. Ademais, camundongos que foram privados de um dos muitos genes de XP sofrem uma suscetibilidade marcada a tumores após a exposição a carcinógenos químicos. Essas duas observações fornecem algumas evidências de que componentes do sistema de reparo por excisão de nucleotídeos codificados por alguns dos genes XP são, não surpreendentemente, responsáveis pelo reparo de danos genéticos criados por outros agentes além da radiação UV. Isso levanta a seguinte questão: por que um humano que não possui um ou outro gene XP possui um risco relativamente pouco aumentado de cânceres nos órgãos internos, apesar de um importante componente da maquinaria de NER estar faltando em todas as células do corpo dessa pessoa? A explicação mais simples e possivelmente correta é que os raios UV são, de longe, os mutágenos ambientais mais importantes aos quais humanos são bastante expostos e, portanto, a fonte da grande maioria das lesões que necessitam de reparo pela maquinaria de NER.

Muitas outras síndromes herdadas também são associadas a defeitos em NER. Por exemplo, indivíduos sofrendo da síndrome de Cockayne (CS) parecem não possuir um ou dois genes

envolvidos na NER acoplada à transcrição. Suas células possuem fotossensibilidade aumentada como aquelas dos pacientes com XP. A idade média de pacientes de CS é 12 anos de idade. Os poucos que sobrevivem à adolescência não mostram taxas aumentadas de câncer. Ainda não considerada, existe a hipótese de que os indivíduos que são *heterozigotos* para um dos alelos mutantes associados à síndrome de Cockayne possuam um risco elevado de desenvolver certos tipos de cânceres.

XP foi apenas a primeira dentre muitas outras síndromes humanas de suscetibilidade a câncer a serem descobertas como sendo causadas por defeitos herdados em diversos tipos de reparo de DNA (Tabela 12.1). Iremos explorar uma outra aqui – o câncer hereditário de cólon sem polipose (HNPCC). A HNPCC é uma síndrome familiar de câncer que representa uma causa bastante comum de cânceres no cólon, sendo responsável por 2 a 3% de todos os casos de câncer de cólon. HNPCC, como seu nome implica, é distinta de outro tipo de predisposição a câncer de cólon que vimos anteriormente – a polipose adenomatosa do cólon (Seção 7.11). Uma subclasse de pacientes com HNPCC possui suscetibilidade aumentada a carcinomas no endométrio, estômago, ovário e trato urinário além de carcinomas de cólon.

A aumentada suscetibilidade ao câncer de pacientes com HNPCC pode ser traçada pela acelerada taxa na qual a progressão de tumor se dá em seus cólons: enquanto a progressão adenoma-para-carcinoma é estimada como requerindo de 8 a 10 anos na população em geral, a instabilidade genética afetando as células de pacientes com HNPCC faz com que esse passo se dê em apenas 2 a 3 anos. De fato, devido a seus adenomas progredirem tão rapidamente, esses crescimentos pré-malignos possuem um tempo de vida relativamente curto e não são, portanto, encontrados em números significativos nos cólons de tais pacientes.

A maioria dos casos de HNPCC resulta de mutações na linhagem germinativa em genes codificando duas importantes proteínas de reparo de pareamento errôneo, MSH2 e MLH1 (Barra lateral 12.8). Alelos mutantes na linhagem germinativa de outros dois genes, *MSH6* e *PMS2*, estão envolvidos em uma pequena proporção desses casos; no entanto, dois outros genes (*PMS1*,

Tabela 12.1 Síndromes familiares de câncer devido a defeitos herdados no reparo de DNA

Nome da síndrome	Nome do gene	Fenótipo do câncer	Enzima ou processo afetado
HNPCC	(4-5 genes) ^a	Polipose colônica	Enzimas de reparo de pareamento errôneo
XP ^b	(8 genes) ^b	Cânceres de pele induzidos por UV	Reparo por excisão de nucleotídeos
AT ^c	<i>ATM</i>	Leucemia, linfoma	Resposta a quebras dsDNA
Distúrbio similar à AT ^c	<i>MRE11</i>	Ainda não determinado	Reparo de dsDNA pela NHEJ
Câncer familiar de mama e câncer de ovário	<i>BRCA1</i> , <i>BRCA2</i> ^d	Carcinomas de mama e ovário	Reparo de dsDNA direcionado por homologia
Werner	<i>WRN</i>	Diversos cânceres	Exonuclease e DNA helicase ^e , replicação
Bloom	<i>BLM</i>	Tumores sólidos	DNA helicase, replicação
Anemia Fanconi	(9 genes) ^f	AML, HNSCC	Reparo de ligações cruzadas e quebras dupla-fita
Quebra de Nijmegen ^g	NBS	Principalmente linfomas	Processamento de quebras dsDNA, NHEJ
Li-Fraumeni	<i>TP53</i>	Cânceres múltiplos	Proteína de alarme de dano ao DNA
Li-Fraumeni	<i>CHK2</i>	Cólon, mama	Cinase sinalizadora de dano ao DNA

^a Cinco genes distintos MMR são transmitidos como alelos mutantes na linhagem germinativa humana. Dois genes MMR – *MSH2* e *MLH1* – estão comumente envolvidos em HNPCC; dois outros genes MMR – *MSH6* e *PMS2* – estão envolvidos em um pequeno número de casos; um quinto gene, *PMS1*, também pode estar envolvido em um pequeno número de casos.

^b Xeroderma pigmentoso, no mínimo oito genes distintos, sete dos quais estão envolvidos em NER. Os sete genes são chamados *XPA* até *XPG*. Um oitavo gene, *XPV*, codifica a DNA polimerase η .

^c Ataxia telangiectasia, pequeno número de casos.

^d Alelos mutantes na linhagem germinativa de *BRCA1* e *BRCA2*, conjuntamente, podem representar 10 a 20% dos cânceres de mama familiares identificáveis.

^e Uma exonuclease digere o DNA ou RNA de uma extremidade em diante; uma helicase desenrola moléculas de DNA dupla-fita.

^f Nove genes foram clonados e ao menos 11 grupos de complementação foram demonstrados. O grupo de complementação J codifica a proteína BACH1, parceira da *BRCA1*.

^g A proteína NBS1 (chamada nibrina) forma um complexo físico com as proteínas Rad50 e Mre11, todas as quais estão envolvidas no reparo de quebras dsDNA. Os fenótipos de pacientes com a síndrome da Quebra de Nijmegen são similares, mas não idênticos àqueles sofrendo de AT.

Adaptada, em parte, de B. Alberts et al., *Molecular Biology of the Cell*, 4th ed. New York: Garland Science, 2002; e de E.R. Fearon, *Science* 278:1043-1050, 1997.

Barra lateral 12.8 Uma convergência na genética de bactérias, leveduras e humanos levou diretamente à descoberta dos genes do câncer hereditário de cólon sem polipose A rota através da qual a base genética da HNPCC foi descoberta é bastante fascinante. Seguindo a co-herdabilidade da suscetibilidade à doença em diversas famílias sofrendo dessa síndrome e a herdabilidade de um grupo de marcadores genéticos espalhados em todo o genoma humano, os geneticistas descobriram duas regiões distintas que pareciam estar associadas com a suscetibilidade à doença. Em algumas famílias, a suscetibilidade à doença era co-segregada com diversos marcadores do Cromossomo humano 2p16, ao passo que, em um segundo grupo de famílias, essa suscetibilidade parecia ser herdada juntamente com marcadores da região cromossomal 3p21.

Ao mesmo tempo, observações importantes dos tipos de aberrações genéticas encontradas em um subgrupo de carcinomas esporádicos de cólon perceberam que segmentos de As (p. ex., A_7) frequentemente foram expandidos ou comprimidos (i. e., substituídos por A_6 ou A_8) nos genomas de células de carcinoma; após isso, mais seqüências microssatélites (p. ex., $[CA]_8$) também foram descobertas como sofren-

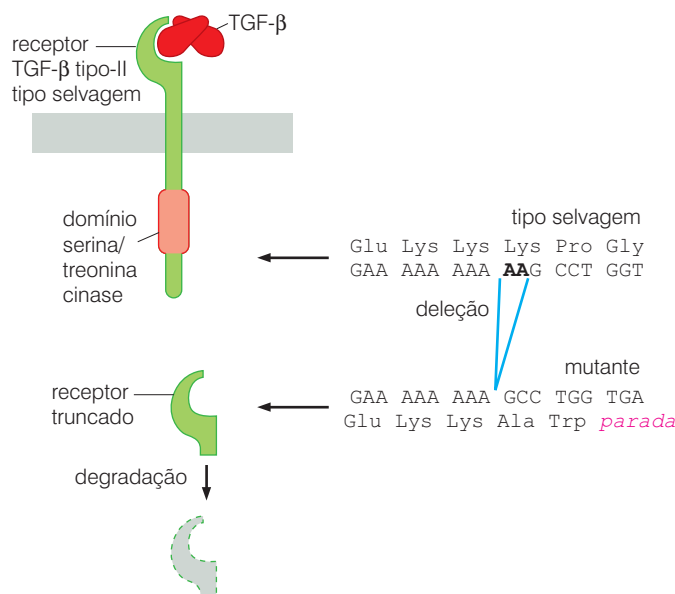
do expansão ou encolhimento (veja a Seção 12.4). Essa instabilidade de microssatélites (MIN) foi identificada como marcante em células cancerosas de indivíduos sofrendo de HNPCC.

Já outros pesquisadores perceberam que essas mudanças na seqüência de DNA são bastante similares às alterações que se acumulavam rapidamente na *E. coli* que possuía versões mutantes de um de dois genes – *mutS* ou *mutL* – envolvidos no reparo de pareamento errôneo (MMR, Seção 12.4); leveduras carregando mutações nos genes homólogos demonstraram aberrações idênticas espalhadas ao longo do genoma. Essa similaridade levou alguns cientistas a determinar se homólogos humanos desses e de outros genes de reparo de pareamento errôneo estavam afetados em pacientes com HNPCC, levando rapidamente à confirmação de que, de fato, o homólogo mutante humano *mutS* (chamado *hMSH2*) foi mapeado no Cromossomo humano 2p16, enquanto um homólogo humano de *mutL* foi mapeado no 3p21. Por fim, membros de um dos grupos de famílias com HNPCC foram descobertos como transmissores de alelos mutantes de *hMSH2*, ao passo que aqueles pertencentes a um segundo grupo de parentes com HNPCC carregavam alelos mutantes de *hMLH1*.

MSH3), que foram identificados como desempenhando papéis igualmente importantes no reparo do DNA, são raramente, se alguma vez, transmitidos como alelos mutantes na linhagem germinativa humana. Similar à genética da maioria dos genes supressores de tumor, os pacientes herdam um alelo deficiente do gene MMR; os genomas em muitas células tumorais que surgiram têm, quase sempre, sofrido uma perda de heterozigiosidade (LOH) que resulta no descarte da cópia do gene sobrevivente tipo selvagem de MMR em questão.

Figura 12.28 Um gene do receptor TGF- β afetado por instabilidade de microssatélites O receptor TGF- β tipo II (TGF- β RII) é frequentemente inativado em cânceres de cólon humanos, exibindo instabilidade de microssatélites e, portanto, carregando defeitos nos genes de reparo de pareamento errôneo (MMR). No caso particular do câncer de cólon, cujo DNA foi analisado aqui, as últimas duas de 10 adeninas (*face em negrito*) foram deletadas da fase de leitura do gene que codifica o receptor ostensivamente devido a um defeito de MMR. Essa deleção em particular ($A_{10} \rightarrow A_8$) resultou em uma mutação sem sentido que causou a terminação prematura da tradução da proteína TGF- β RII nascente e, assim, na perda de domínios sinalizadores funcionalmente críticos na porção C-terminal do receptor. Esta perda, por sua vez, permitiu que as células progenitoras do carcinoma de cólon se tornassem resistentes aos efeitos inibitórios de crescimento de TGF- β . Alterações dessa porção de As no gene de TGF- β RII foram subsequentemente encontradas em 100 de 111 carcinomas colorretais apresentando MMR defeitiva, nas quais elas fizeram com que a tradução do mRNA de TGF- β RII originasse polipeptídeos de 129 ou 161 aminoácidos (dependendo de quantos As foram deletados) em vez dos 565 resíduos de aminoácidos presentes no receptor tipo selvagem. (De C. Lengauer, K.W. Kinzler and B. Vogelstein, *Nature* 396: 643-649, 1998.)

A resultante incapacidade de detectar e reparar apropriadamente erros no pareamento de seqüências leva, dentre outras conseqüências, a altas taxas de mutações em genes que abrigam repetições de microssatélites em seus genomas. Uma ilustração dramática e prematura das conseqüências desse defeito no reparo vem do estudo de um grupo de 11 linhagens celulares de câncer colorretal que mostraram instabilidade de microssatélites. Em nove dessas linhagens celulares, o gene codificando o receptor tipo II de TGF- β (TGF- β RII) foi encontrado mutado. Mais especificamente, a fase de leitura do tipo selvagem desse gene carrega uma faixa de 10As em uma fileira (Figura



12.28). No entanto, nessas nove linhagens de células tumorais, o gene TGF- β RII foi encontrado como tendo perdido um ou dois As da fileira **homopolimérica** normalmente presente. Tais alterações de sequência forçaram a sequência codificadora do gene TGF- β RII para fora de sua fase de leitura e resultaram em proteínas TGF- β RII não-funcionais.

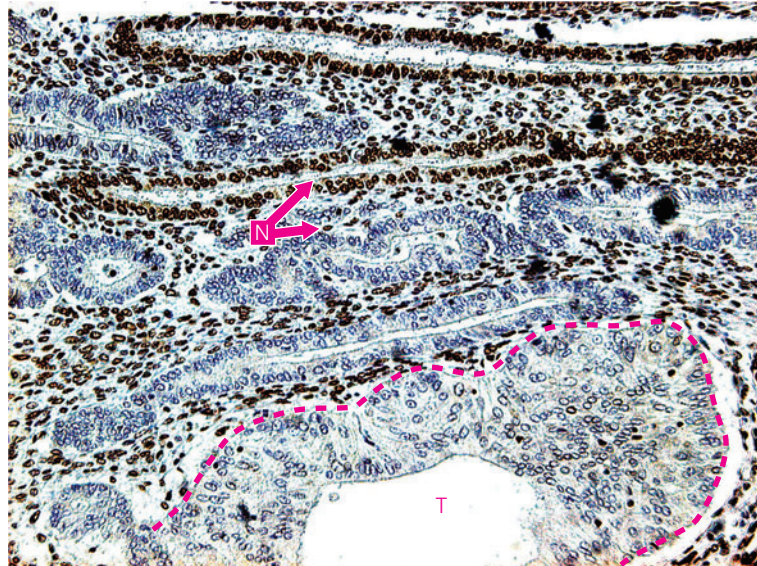
Podemos imaginar que, uma vez que os precursores de células tumorais não mais expressam o TGF- β RII funcional, eles podem escapar dos efeitos inibitórios de crescimento desse fator antimitogênico (Seção 8.4) – uma característica altamente vantajosa se adquirida cedo na progressão de tumor por células epiteliais. Em um estudo subsequente de uma série de 110 carcinomas de cólon que exibiam instabilidade de microssatélites, 100 foram encontrados carregando alelos mutantes, defectivos do gene TGF- β RII, com quase todos os alelos mutantes presentes em configuração homozigota. Assim, uma vez que um dos genes que codifica receptores sofra uma mutação que o inative, o alelo sobrevivente tipo selvagem é descartado por meio da perda da heterozigosidade.

Posteriormente, ainda outros genes que sofreram mutações similares foram encontrados em células de câncer defectivas no reparo de pareamento errôneo (Tabela 12.2). Na grande maioria dos casos listados na Tabela 12.2, o defeito no MMR e os alelos mutantes resultantes foram descobertos em cânceres esporádicos (em vez de nos familiares). Tais observações apontam para o fato de que, em tumores não-familiares, os genes MMR, da mesma forma que genes supressores de tumor, podem ser tornados defectivos tanto por mutação somática como por metilação de promotor, resultando no silenciamento transcricional (Seção 7.8). Na verdade, este segundo mecanismo é responsável pela maior parte do MMR defectivo nesses tumores: em torno de 15% dos tumores esporádicos gástricos, colorretais e do endométrio apresentam MMR defectiva, e, em quase todos esses, a instabilidade de microssatélite observada pode ser traçada até a metilação e resultante silenciamento do gene *MLH1*. De maneira interessante,

Tabela 12.2 Genes e proteínas que foram inativados nos genomas de células de câncer humanas devido a defeitos no reparo de pareamento errôneo

Gene	Função da proteína codificada	Seqüência codificadora tipo selvagem	Cólon	Estômago	Endométrio
<i>ACTRII</i>	Receptor GF	A ₈	X		
<i>AIM2</i>	Induzível por interferon	A ₁₀	X		
<i>APAF1</i>	Fator pró-apoptótico	A ₈	X	X	
<i>AXIN-2</i>	Sinalização Wnt	A ₆ , G ₇ , C ₆	X		
<i>BAX</i>	Fator pró-apoptótico	G ₈	X	X	X
<i>BCL-10</i>	Fator pró-apoptótico	A ₈	X	X	X
<i>BLM</i>	Resposta a dano no DNA	A ₉	X	X	X
<i>Caspase-5</i>	Fator pró-apoptótico	A ₁₀	X	X	X
<i>CDX2</i>	Homeobox TF	G ₇	X		
<i>CHK1</i>	Resposta a dano no DNA	A ₉	X		X
<i>FAS</i>	Fator pró-apoptótico	T ₇	X		X
<i>GRB-14</i>	Transdução de sinal	A ₉	X	X	
<i>hG4-1</i>	Ciclo celular	A ₈	X		
<i>IFRIIR</i>	Mimetiza receptor GF	G ₈	X	X	X
<i>KIAA097</i>	Desconhecida	T ₉	X		
<i>MLH3</i>	MMR	A ₉	X		X
<i>MSH3</i>	MMR	A ₈	X	X	X
<i>MSH6</i>	MMR	C ₈	X	X	X
<i>NADH-UO8</i>	Transporte de elétrons	T ₉	X		
<i>OGT</i>	Glicosilação	T ₁₀	X		
<i>PTEN</i>	Pró-apoptótico	A ₆	X		X
<i>RAD50</i>	Resposta a dano no DNA	A ₉	X	X	
<i>RHAMM</i>	Mobilidade celular	A ₉	X		
<i>RIZ</i>	Fator pró-apoptótico	A ₈ , A ₉	X	X	X
<i>SEC63</i>	Translocação de proteínas no retículo endoplasmático	A ₁₀ , A ₉	X		
<i>SLC23A1</i>	Transportador	C ₉	X		
<i>TCF-4</i>	Fator de transcrição	A ₁₀	X	X	X
<i>TGF-βRII</i>	Receptor de TGF- β	A ₁₀	X	X	X
<i>WISP-3</i>	Fator de crescimento	A ₉	X		

Figura 12.29 Supressão da atividade de MLH1 no tecido do endométrio Um anticorpo anti-hMLH1 foi utilizado em imuno-histoquímica, na qual o anticorpo foi acoplado a uma enzima peroxidase para gerar um ponto marrom-escuro em qualquer ponto que ele ligue o antígeno MLH1. Conforme indicado aqui, o tecido do endométrio normal (*N* rosa) de um paciente com câncer no endométrio mostrou áreas de coloração marrom-escuro intensa, indicando alta expressão de hMLH1 (*N*, seta rosa mais acima), bem como uma coloração fraca (*N*, seta rosa mais abaixo), em que núcleos celulares (azul-claro), corados com um corante específico para DNA (DAPI), são aparentes, mas nenhuma coloração de MLH1 é vista. O tecido do endométrio com carcinoma (*linha pontilhada rosa*, *T*) está virtualmente sem a coloração por hMLH1, o que revela, portanto, apenas a coloração fraca dos núcleos celulares pelo DAPI. Análises moleculares (*não-mostradas*) indicaram que o promotor do gene *hMLH1* nas células de carcinoma estava fortemente metilado. O fato de que a expressão de hMLH1 estava ausente em alguns dos tecidos histologicamente normais adjacentes ao tumor indica que a perda da expressão de hMLH1 ocorreu relativamente cedo na progressão do tumor e precedeu as alterações histopatológicas que levaram à formação do carcinoma. (De T. Kanaya, S. Kyo, Y. Maida et al., *Oncogene* 22:2352-2360, 2003.)



o tecido endometrial histologicamente normal adjacente a tumores com MMR defeitivo, o gene *MLH1* é frequentemente encontrado metilado, sugerindo que tal metilação é um dos eventos iniciais na progressão do tumor nesse tecido (Figura 12.29).

Junto à perda da função do reparo de pareamento errôneo, células que perderam a expressão de MLH1 ou MSH2 também se tornam resistentes a mutágenos alquilantes que iriam normalmente ativar o ponto de confirmação G2/M do ciclo celular ou induzir apoptose; essas células continuam a avançar para o G2/M e obtêm sucesso ao evitar a apoptose após a exposição a esses agentes danificadores do DNA. Além disso, versões mutantes de MSH2 que inativam seletivamente a função MMR podem ser criadas sem que afetem a capacidade de desencadear a apoptose em resposta a certos tipos de dano ao DNA. Isso sugere que nessa proteína MMR em particular, domínios distintos estão envolvidos na detecção de DNA danificado, reparando esse dano e emitindo sinais de alarme, incluindo aqueles que levam à apoptose.

A observação repetida de genes de reparo metilados com pareamento errôneo fornece uma evidência direta de que um defeito somaticamente adquirido (i. e., não-herdado) na função de reparo do DNA confere vantagem replicativa em células pré-malignas evoluindo durante o curso da progressão de tumor. Em muitos dos genomas de células tumorais apresentando instabilidade de microssatélites, existem centenas, provavelmente milhares, de genes que são concomitantemente mutados; os genes mostrados na Tabela 12.2 representam apenas uma pequena proporção desse grupo.

Os dados da Tabela 12.2 são tendenciosos pelo fato de que apenas um grupo arbitrário de genes foi examinado, e apenas as seqüências associadas aos microssatélites homopoliméricos desses genes foram seqüenciadas. Além disso, essa lista é mais interessante. Ela mostra que o gene *BAX*, que codifica uma importante proteína pró-apoptótica (Seção 9.9), pode ser silenciado por meio de mutações provocadas por uma seqüência de oito Gs em sua fase de leitura normal e um defeito no reparo MMR. Outros genes apoptóticos também foram descobertos como sofrendo mutações diretamente traçáveis no número de bases em uma de suas seqüências homopoliméricas. Mesmo os genes que codificam proteínas MMR são inativados por defeitos MMR!

Futuras pesquisas irão revelar que a inativação de alguns dos genes listados na Tabela 12.2 resulta em vantagem replicativa para células tumorais. Ainda, sucessos em tais pesquisas irão conduzir a outras questões importantes não-respondidas: por que os defeitos MMR e a ins-

tabilidade de microssatélites resultante associam-se preferencialmente a carcinomas de cólon, estômago, ovário e endométrio e muito menos freqüentemente a tumores surgindo em outros locais do corpo?

12.10 Diversos outros defeitos no reparo de DNA conferem suscetibilidade aumentada por meio de mecanismos pouco entendidos

Sem dúvida, os genes mais notórios associados ao câncer, ao menos para o público, são *BRCA1* e *BRCA2*. Alelos mutantes da linhagem germinativa de qualquer um desses genes conferem uma suscetibilidade inata a carcinomas de mama e ovário. Por exemplo, quase metade de todos os cânceres de mama familiares identificados envolvem transmissão de um alelo mutante de *BRCA1* e *BRCA2* da linhagem germinativa; de acordo com algumas estimativas, 70 a 80% de todos os cânceres familiares de ovário devem-se a alelos mutantes de linhagem germinativa de *BRCA1* ou *BRCA2*. Quando esses dois genes foram primeiramente descobertos, parecia que eles deveriam ser incluídos entre os genes supressores de tumor, que são conhecidos por estarem envolvidos na regulação da dinâmica da proliferação celular, na sobrevivência e na diferenciação (Capítulo 7). Porém, diversas evidências construíram uma instância persuasiva de que esses dois genes estariam realmente envolvidos na manutenção da integridade genômica e de que eles deveriam, portanto, ser chamados de *caretakers* (proteínas de reparo de DNA) em vez de *gatekeepers* (proteínas supressoras de tumor).

O caso da participação desses genes na manutenção genômica pode ser apresentado utilizando-se evidência de culpa por associação. As proteínas BRCA1 e BRCA2 são encontradas em grandes complexos físicos umas com as outras e com um grande número de outras proteínas no núcleo celular. Esses complexos massivos carregam, juntamente com outros componentes, as proteínas RAD50/Mre11 e RAD51 – homólogas das duas proteínas inicialmente descobertas em levedura devido ao importante papel que desempenhavam no reparo de quebras no DNA causadas por radiação ionizante (i. e., raios X). Proteínas de reparo de pareamento errôneo também foram encontradas em tais complexos.

Bastante dramaticamente, o tratamento de células com hidroxiuréia, que resulta em uma parada da forquilha de replicação durante a fase S, faz com que moléculas de BRCA1 modifiquem sua localização no núcleo. Muitas dessas forquilhas paradas são sugeridas como locais de quebras dsDNA, que resulta de quebras acidentais na fita simples, ainda não replicada, nas forquilhas (veja a Figura 12.10); as quebras resultantes são geralmente reparadas pelo reparo dirigido por homologia (HDR). Conforme visualizado por microscopia de imunofluorescência, moléculas de BRCA1 estão normalmente distribuídas em um grande número de pequenos pontos pelo núcleo; a hidroxiuréia faz com que as moléculas de BRCA1 deixem esses pontos e aglomerem-se em um número menor de pontos grandes, discretos, nos quais o antígeno nuclear de célula em proliferação (PCNA) – sabidamente localizado nas forquilhas de replicação – também pode ser encontrado (Figura 12.30A). Tais pontos também foram descobertos por conterem diversas outras proteínas de reparo de DNA conhecidas, incluindo Rad50 e Rad51. A proteína BRCA2 também pode ser encontrada neles, fornecendo evidências inferidas adicionais da sua colaboração em processos de reparo de DNA. Além disso, quando quebras dsDNA são intencionalmente criadas em áreas discretas dentro do núcleo celular utilizando um feixe de *laser* estreito, a proteína BRCA1 se co-localiza em tais áreas juntamente com γ -H2AX, uma histona fosforilada que está presente em sítios de cromatina que flanqueiam locais de dano dsDNA (Figura 12.30B). Ao todo, 12 proteínas celulares distintas, a maioria conhecida pelo envolvimento com o reparo de DNA, foram descobertas sendo recrutadas para essas áreas de dano.

Camundongos que foram geneticamente privados de toda a função de BRCA1 morrem no início da embriogênese, porém alelos mutantes de linhagem germinativa de BRCA2 que causam perda apenas parcial de função resultam em suscetibilidade a malignidades linfóides e aberrações cromossômicas pouco usuais. Essas aberrações possuem estruturas que sugerem altas taxas de recombinação ilegítima, ou seja, eventos de recombinação (ou fusões) entre

dois braços cromossômicos que não são homólogos um ao outro (Figura 12.31A). Tais estruturas cromossômicas resultam caracteristicamente do reparo inadequado de quebras dsDNA, muitas das quais podem surgir acidentalmente nas forquilhas de replicação durante a fase S típica do ciclo celular (veja a Figura 12.10). Além disso, as duas filhas de uma célula que não possui função completa de BRCA2 são incapazes de separar-se uma da outra durante a citocinese que segue a mitose; os efeitos precisos que esse defeito de **abscisão** (Figura 12.30B) possui no cariótipo ainda necessitam ser elucidados. Esse defeito de abscisão indica que BRCA2 possui funções que não são diretamente conectadas com seu papel principal na organização do reparo de quebras dsDNA. Outras indicações, ainda, do reparo defeituoso de dsDNA em células mutantes de *BRCA1* e *BRCA2* vieram dos experimentos que testaram a capacidade de células em cultura para recuperar quebras dupla-fita (ds) introduzidas em seu DNA cromossomal por raios X. Células em cultura que não possuem a maior parte da função de BRCA1 demonstram sensibilidade muito aumentada à morte por raios X.

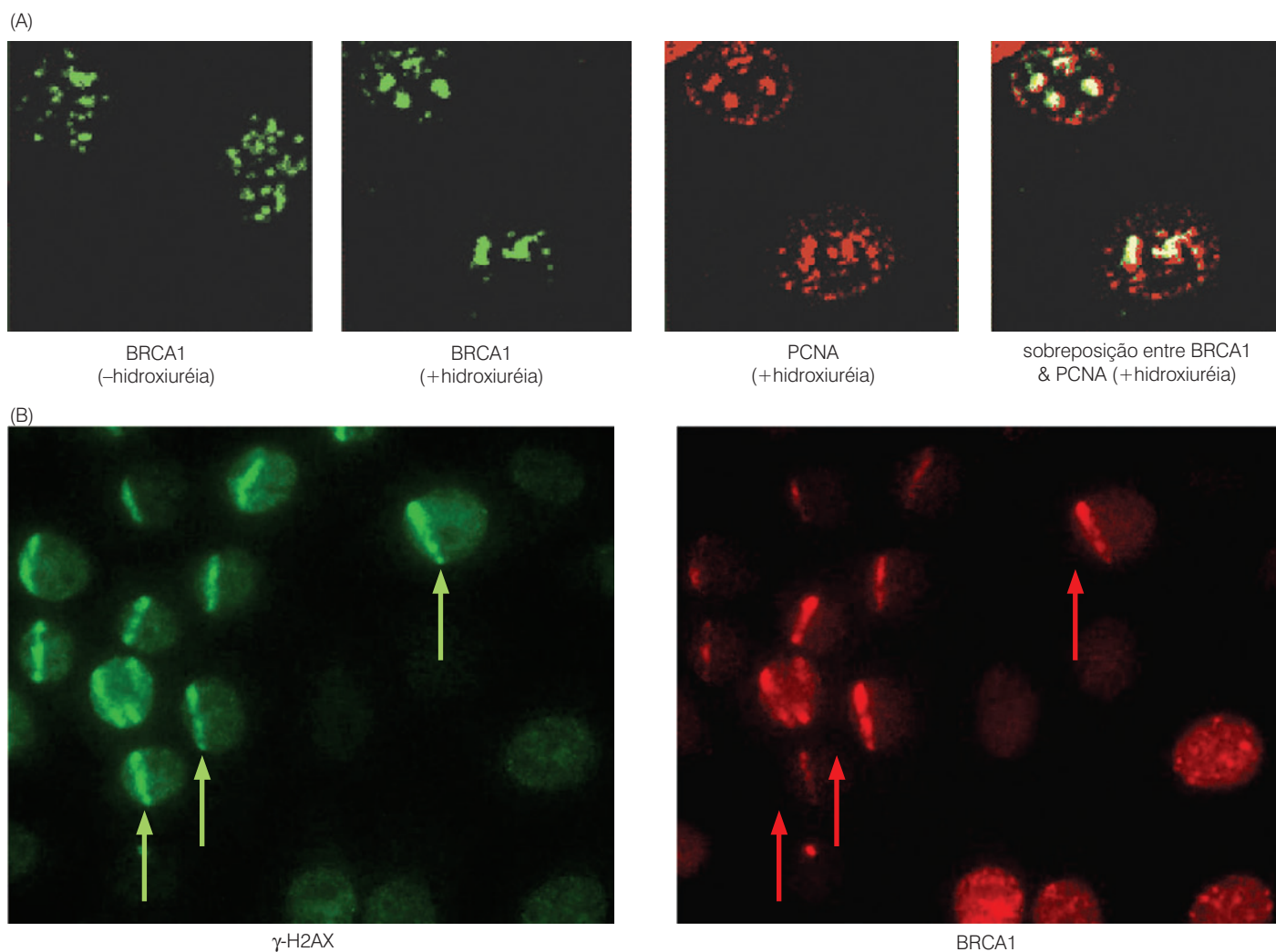


Figura 12.30 BRCA1 e resposta ao dano de DNA (A) A proteína BRCA, que pode ser detectada por anticorpos fluorescentemente marcados, em geral é encontrada durante a fase S em um grande número de pontos discretos, pequenos, por todo o núcleo (*verde, 1ª painel*). No entanto, quando células na fase S são tratadas com hidroxiuréia (HU), que pára a forquilha de replicação, as moléculas da proteína BRCA1 abandonam esses pontos e se congregam em pequenos números de pontos bastante grandes (*verde, 2ª painel*). Um padrão similar de relocalização pode ser observado com o antígeno nuclear de célula em proliferação (PCNA), que é conhecido por estar associado às forquilhas de replicação (*vermelho, 3ª painel*). Uma colocalização substancial de BRCA1 e PCNA é indicada pelos pontos amarelos (*4ª painel*). Essas forquilhas de replicação

paralisadas freqüentemente são locais de quebras dupla-fita (ds) de DNA causadas pela quebra acidental de fitas simples de DNA ainda não replicadas (e, portanto, frágeis) nas forquilhas de replicação (veja a Figura 12.10); tais observações sugerem que BRCA1 é recrutada a locais de quebras dsDNA. (B) Um *laser* UV de 355 nm foi utilizado para pintar tiras estreitas ao redor de núcleos individuais, que foram então analisados por imunocoloração com anticorpos reativos tanto com γ-H2AX (uma histona fosforilada que é conhecida por localizar-se na cromatina que flanqueia quebras dsDNA; *verde*) ou BRCA1 (*vermelho*). Essa co-localização indica que BRCA1 é atraída para áreas de quebra dsDNA. (A, de R. Scully, J. Chen, R.L. Ochs et al., *Cell* 90:425-435, 1997; B, de R.A. Greenberg, B. Sobhian, S. Pathania et al., *Genes Dev.* 20:34-46, 2006.)

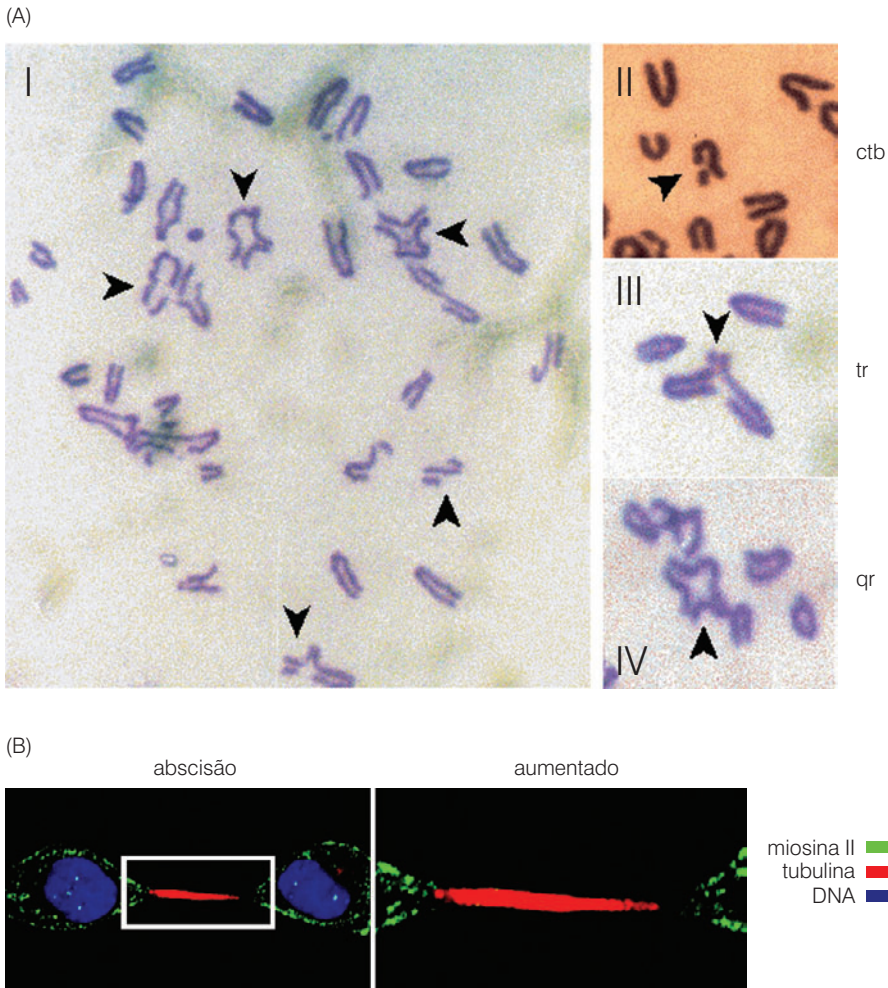


Figura 12.31 Alterações cariotípicas devido a perda parcial da função de BRCA2 (A) Várias anormalidades cariotípicas têm sido observadas em fibroblastos em cultura preparados de um embrião de camundongo que era homozigoto para um alelo do gene *Brca2* que codifica uma proteína *Brca2* truncada. Entre tais anormalidades, estão incluídas fusões entre braços cromossômicos, resultando em translocações cromossômicas que são frequentemente manifestadas pela presença de pares de cromátides aberrantes durante a metáfase da mitose. Essas fusões com frequência são causadas por quebras de dsDNA não-reparadas ou inapropriadamente reparadas. Quando as cromátides híbridas resultantes de tais fusões pareiam com cromátides irmãs que não foram afetadas por tais translocações, estruturas como aquelas vistas aqui são observadas (painel I). Entre as estruturas cromossômicas aberrantes resultantes de quebras dsDNA estão as quebras de cromátides (painel II), os cromossomos trirradiais (painel III) e os cromossomos tetrarradiais (painel IV) nessa disposição cromossômica da metáfase. Pareamentos de cromátides como essas são raramente observados em células tipo selvagem. (B) Na ausência de função apropriada de BRCA2, o crescimento e a divisão celulares podem ser rompidos por meio de um mecanismo que não parece estar conectado com o reparo defeutivo de DNA. Então, o último estágio da citocinese (o momento após a mitose no qual as células-filhas se separam uma da outra) envolve o processo de *abscisão*, que depende, por sua vez, da clivagem dos microtúbulos dos fusos restantes que ainda conectam as duas células-filhas. Em células mutantes para *Brca2*, esse componente do programa de abscisão também está defeitivo. (A, de K.J. Patel, V.P. Yu, H. Lee et al., *Mol. Cell* 1:347-357, 1998; B, de A.R. Venkitaraman, *Science* 306: 876-879, 2004.)

O reparo de quebras dsDNA em uma cromátide com frequência depende da habilidade do aparato de reparo de consultar suas seqüências de DNA homólogas não-danificadas, intactas, presentes em uma cromátide irmã, utilizando a seqüência do segmento de DNA ainda intacto para instruir o aparato de reparo sobre como a dupla hélice quebrada deve ser reconstruída (Figura 12.32). Então, tal reparo dirigido por homologia (HDR) ocorre grandemente durante a fase S tardia e na fase G₂ do ciclo celular, quando a dupla hélice em uma cromátide irmã pode fornecer a informação sobre a seqüência para reparar a cromátide danificada. (Lembre-se que, durante a fase S, a replicação do DNA resulta na produção de duas cromátides idênticas que permanecem associadas como parte de um cromossomo comum até que elas sejam separadas durante a próxima mitose.) O HDR também pode ser utilizado se ligações covalentes cruzadas entre fitas de uma dupla hélice surgem.

Todos os tipos de reparo dirigido por homologia (HDR) estão comprometidos em células que não possuem a função de BRCA1 ou BRCA2. Isso pode ser explicado, em parte, pelo comportamento da proteína RAD51, com quem a parceira de BRCA1, BRCA2, associa-se diretamente. RAD51 é conhecida por ligar-se a moléculas fita simples de DNA, permitindo que elas invadam (e, assim, desenrolem) duplas hélices homólogas, um processo essencial para iniciar HDR (veja a Figura 12.32). (O fato de que BRCA2 possui oito domínios BRC, cada um dos quais pode, a princípio, ligar uma molécula de RAD51, sugere que BRCA2 pode realmente reunir cadeias de moléculas de RAD51 para ligar-se coordenadamente a ssDNA.) Na ausência de BRCA1 ou BRCA2, RAD51 pode não ser apropriadamente recrutada a locais de quebras dsDNA, e os passos subsequentes de HDR podem não ser capazes de ocorrer corretamente. Os cromossomos trirradiais e tetrarradiais

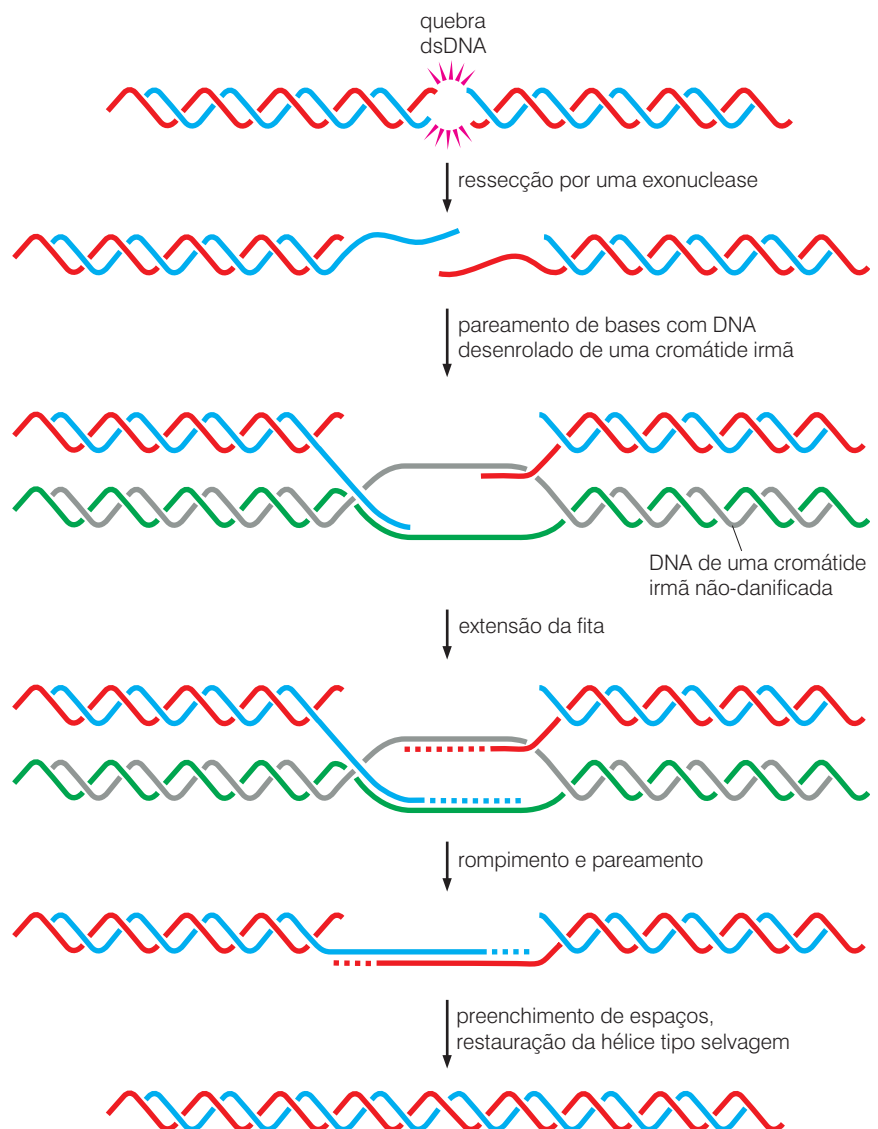
que são encontrados na metáfase de células mutantes para *Brca2* (veja a Figura 12.31A) são manifestações da incapacidade do aparato de reparo dessas células, em utilizar HDR para consertar quebras dsDNA.

O reparo dirigido por homologia (HDR) também está defeituoso em pacientes sofrendo da síndrome de quebra de Nijmegen (veja a Tabela 12.1). Suas células, que não possuem a proteína Nbs1, falham ao executar os passos iniciais de HDR. Sem essa habilidade de explorar HDR, as células de tais pacientes irão se rearranjar para uma fusão de duas extremidades de dsDNA por meio do processo chamado **união de extremidades não-homólogas** (NHEJ); Figura 12.33.

NHEJ é inevitavelmente um processo sujeito a erro, simplesmente porque o alinhamento entre os dois segmentos de DNA a serem fusionados não é informado pelas seqüências de DNA presentes na cromátide irmã. Como consequência, as fusões entre extremidades resultantes geram seqüências mutantes no local da junção, o que explica as altas taxas de malignidades hematopoiéticas em pacientes sofrendo da síndrome da quebra de Nijmegen. Camundongos que são defeituosos para um ou outro componente da maquinaria NHEJ e também não possuem a função p53 desenvolvem linfomas a taxas extremamente altas.

De forma interessante, NHEJ ocorre muito na fase G1 do ciclo celular, quando as cromátides irmãs não estão disponíveis para permitir o reparo dirigido por homologia. NHEJ é

Figura 12.32 Reparo direcionado por mutagênese O reparo de quebras dsDNA durante a fase S tardia e a fase G₂ do ciclo celular com frequência depende da capacidade do aparato de reparo de consultar seqüências presentes na cromátide irmã não-danificada que foi formada previamente, juntamente com a cromátide danificada, durante a fase S mais recente. Tal reparo dirigido por homologia (HDR) inicia (*acima*) com a *ressecção* (remoção) por uma exonuclease de uma das duas fitas de DNA em cada uma das extremidades formadas por quebras dsDNA. Cada uma das fitas ssDNA resultantes (*azul, vermelho*) é então forçada a invadir a dupla hélice formada pelas duas fitas (*verde, cinza*) da cromátide irmã não-danificada; esta cromátide irmã não-danificada foi desenrolada pelo aparato de reparo para acomodar o pareamento das fitas invasoras de ssDNA a seqüências complementares presentes na cromátide irmã não-danificada. As fitas ssDNA da cromátide danificada são então estendidas na direção 5'-para-3' pela DNA polimerase, utilizando as fitas de DNA da cromátide irmã como molde. Após, as fitas de ssDNA resultantes são liberadas da cromátide irmã e pareadas uma com a outra, permitindo que a extensão prossiga por uma DNA polimerase e uma ligase, que juntas reconstróem a dupla hélice possuidora de seqüências de DNA tipo selvagem. Incluídas entre as proteínas de reparo de DNA que se sabe ou se suspeita que facilitem esses passos complexos de HDR estão RAD51, BRCA1 e BRCA2.



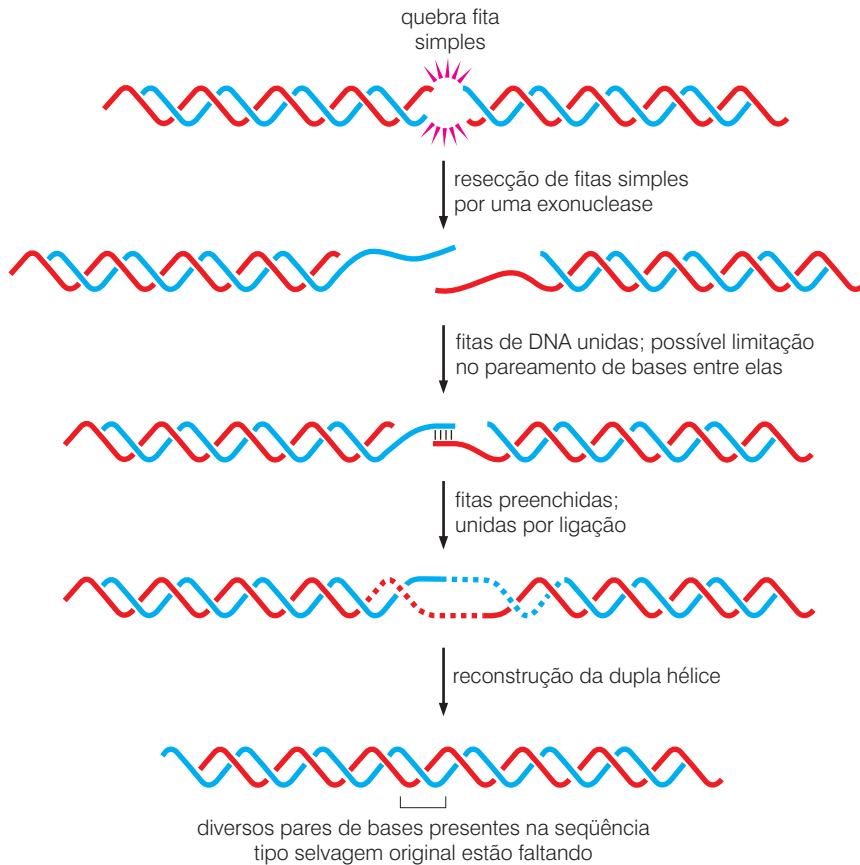


Figura 12.33 União de extremidades não-homólogas NHEJ é utilizada para restaurar a dupla hélice do DNA após uma quebra dupla-fita quando as seqüências de nucleotídeos presentes em uma cromátide irmã não estão disponíveis para instruir o aparato de reparo sobre como essas extremidades deveriam ser unidas de maneira apropriada (veja a Figura 12.32). Na NHEJ, a resecção de fitas simples de ambas as extremidades quebradas resulta em ssDNAs que podem ser então unidos uns aos outros, possivelmente por um grau limitado de pareamento de bases entre eles; quatro pares de bases são mostrados aqui. O subsequente preenchimento de vãos de fita simples e a ligação de quaisquer quebras ssDNA remanescentes resultam na reconstrução de uma dupla hélice que não possui alguns dos pares de bases presentes na hélice original não-danificada do DNA. (Adaptado de M.R. Lieber, Y. Ma, U. Pannicke and K. Schwarz, *DNA Repair* 3:817-826, 2004.)

virtualmente único entre os processos de reparo de DNA, já que ele possui um papel na função fisiológica normal, não-relacionada à reparação de dano ao DNA. (Barra lateral 12.9).

Ainda não está claro precisamente como *BRCA1* e *2* contribuem para a manutenção da estrutura normal do DNA e dos cromossomos e, portanto, previnem o câncer. O fato de que *BRCA1* e *BRCA2* podem se ligar a tantas proteínas nucleares distintas, muitas envolvidas no reparo de DNA (Figura 12.34A), sugere que elas agem, ao menos em parte, como arcabouços moleculares que auxiliam na formação de grandes complexos dessas outras proteínas e as coordenam para ação. Uma vez montadas, essas diversas proteínas de reparo complexadas presumivelmente colaboram no reparo de lesões, em geral as quebras dupla-fita no DNA. Além disso, como a Figura 12.34B ilustra, a perda de *BRCA1* pode danificar certos controles em pontos de checagem do ciclo celular que normalmente respondem ao DNA danificado.

Não sabemos por que a herança de alelos mutantes dos genes *BRCA1* e *BRCA2* leva preferencialmente a cânceres nas mamas e ovário ou por que mutações somáticas de *BRCA2* estão normalmente associadas a carcinomas de próstata e cólon. Ademais, a **penetrância** dos alelos de linhagens germinativas mutantes de *BRCA1* e *BRCA2* (i. e., o grau no qual cada alelo exerce um efeito observável no fenótipo) também tem sido difícil de quantificar.

Já que a função de *BRCA1* é estudada cada vez com maior detalhe, seus mecanismos de ação tornam-se cada vez mais confusos, pelo simples fato de que funções bioquímicas distintas são atribuídas a essa proteína bastante grande e suas “parceiras fisicamente associadas”. Por exemplo, *BRCA1* associa-se a diversos reguladores transcricionais. Também está claro que células de fêmeas que não possuem a função de *BRCA1* são incapazes de inativar adequadamente um dos dois cromossomos X em suas células somáticas (Barra lateral 1.2). A forma como isso está conectada às funções de reparo do DNA e à tendência de mutantes de linhagem germinativa de alelos de *BRCA1* de gerar quase que exclusivamente cânceres em fêmeas permanece obscura.

Barra lateral 12.9 NHEJ e o desenvolvimento da função imune A maquinaria de NHEJ possui um papel integral no processo de rearranjo de genes que leva à formação de anticorpos funcionais e receptores de células T. Por exemplo, a formação das seqüências de DNA que codificam sítios de ligação de antígenos dependem do rearranjo e fusão dos segmentos cromossômicos V, D e J. Na ausência de todas as proteínas componentes de reparo necessárias para NHEJ, tais fusões de segmentos não podem ocorrer. Isso resulta na incapacidade de criar moléculas apropriadas de imunoglobulina (anticorpos) e receptores de células T, comprometendo tanto a resposta humoral quanto a celular do sistema imune (a serem descritas na Seção 15.1) e criando a síndrome da imunodeficiência severa combinada (SCID). Similarmente, NHEJ é necessária para permitir que a maioria das **mudanças de classe** ocorra; esse processo normalmente capacita segmentos VDJ, que codificam as porções de ligação ao antígeno das imunoglobulinas, a ligarem-se a regiões constantes alternativas dos segmentos de genes que codificam as imunoglobulinas, gerando várias classes de moléculas de anticorpo.

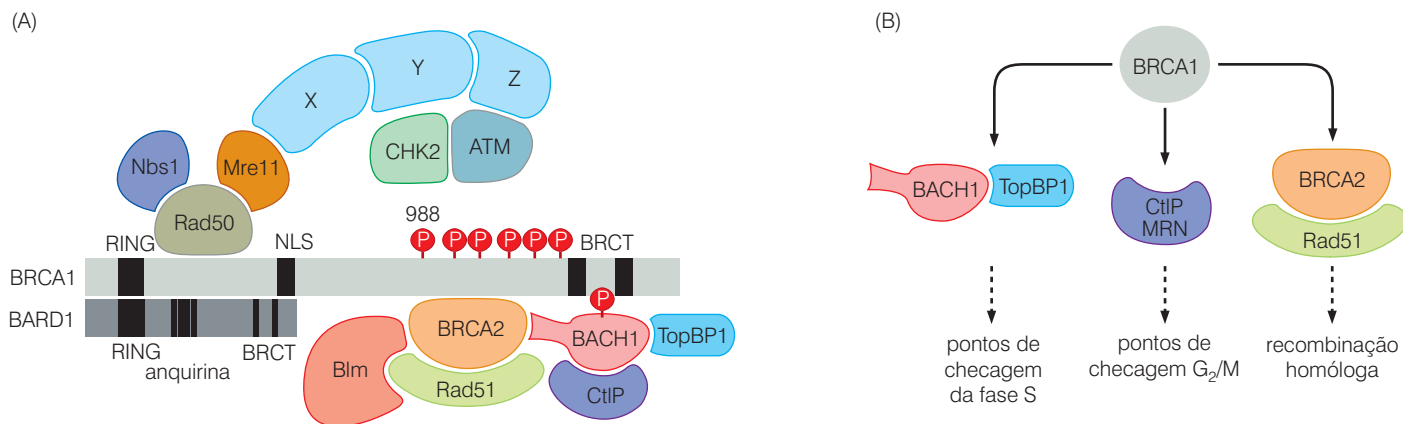


Figura 12.34 BRCA1, BRCA2 e suas parceiras (A) As proteínas BRCA1 e BRCA2 atuam, ao menos em parte, como arcabouços para a montagem de um grupo de outras proteínas de reparo em grandes complexos físicos. Uma vez montados, esses complexos multiprotéicos auxiliam no reparo de quebras dsDNA, geralmente por meio do reparo dirigido por homologia (HDR). Por exemplo, um éxon do gene *BRCA2* codifica oito cópias de um “domínio BRC” (não-mostrado); estas auxiliam no recrutamento de múltiplas moléculas de RAD51, que formam filamentos e protegem fitas ssDNA como parte do processo HDR ilustrado na Figura 12.32. O

complexo MRN, composto por MRE11, rad50 e Nbs1, parece ser capaz de reconhecer a extremidade criada por uma quebra dsDNA e ativar a função ATM cinase em resposta. (B) A perda de diferentes parceiros de BRCA1 afeta especificamente diferentes controles de pontos de verificação do ciclo celular, além de comprometer os processos de recombinação homóloga e o reparo dirigido por homologia. Isso ilustra o controle central que BRCA1 possui como arcabouço para uma vasta gama de proteínas envolvidas em diversos processos envolvendo o funcionamento do DNA. (A e B, cortesia de R.A. Grenberg and D.M. Livingston.)

12.11 O cariótipo de células de câncer com frequência é alterado por meio de alterações na estrutura cromossomal

Muito antes das sutilezas dos danos ao DNA e seu reparo serem reconhecidas, cariótipos aberrantes eram sabidamente presentes em células cancerosas. De fato, por quase um século, células de câncer foram descobertas por frequentemente carregarem cromossomos que pareciam anormais. Os cromossomos trirradiais e tetrarradiais da metáfase vistos em células que não possuíam a função de BRCA1 ou BRCA2 eram exemplos de tais aberrações (veja a Figura 12.31A). Afastando-nos por um momento dessas aberrações particulares, podemos reconhecer que duas classes distintas de anormalidades cariotípicas podem ser vistas em células de câncer: alterações nas *estruturas* de cromossomos individuais e mudanças no *número* de cromossomos que não possuem efeito na estrutura cromossomal.

Um desvio freqüente do cariótipo diplóide normal envolve um aumento ou diminuição do número de cromossomos específicos. Em uma ocasião, por meio de vários acidentes ocorrendo durante a mitose, células cancerosas podem adquirir genomas **poliplóides**, nos quais um complemento haplóide adicional de cromossomos é adquirido (levando a um estado **triplóide**) ou ainda um complemento extra diplóide de cromossomos é adquirido (levando a um estado **tetraplóide**). Alternativamente, cópias extras de cromossomos individuais podem estar presentes ou, menos comumente, uma cópia de cromossomo pode estar faltando.

O termo **aneuploidia** em geral é reservado para os tipos de desvios de um cariótipo normal (ou **euplóide**) que envolve mudanças no *número* de cromossomos. Recentemente, no entanto, o uso do termo aneuploidia foi ocasionalmente estendido para incluir alterações nas *estruturas* de cromossomos individuais, que são prevalentes em células da grande maioria dos tumores sólidos (> 85%); um termo mais específico é “aberração cromossômica”, que utilizaremos neste livro. Esses dois tipos principais de alterações cariotípicas surgem por meio de mecanismos fundamentalmente diferentes.

Iremos adiar discussões de alterações no número de cromossomos até a próxima seção. Por enquanto, revisaremos os mecanismos responsáveis por mudanças na estrutura cromossômica, alguns dos quais já encontramos em muitos pontos deste texto. Por exemplo, como vimos

na Seção anterior, quebras dsDNA não-reparadas, muitas das quais ocorrem acidentalmente nas forquilhas de replicação, são tidas como fonte principal de translocações cromossômicas.

Junto a isso, muito mais cedo (Capítulo 4), aprendemos sobre uma classe de alterações cromossômicas associadas ao câncer como parte de uma discussão dos mecanismos que levam à criação dos oncogenes *myc* e *bcr-abl*. Lembre-se dos casos bem-estudados das translocações que fusionam o proto-oncogene *myc* a seqüências promotoras derivadas de um dentre três genes alternativos de imunoglobulinas (Seção 4.5). Nesse e em outros linfomas, é provável que a maquinaria complexa dedicada ao rearranjo dos genes da imunoglobulina e do receptor de célula T (TCR) (veja a Barra lateral 12.9) erre o alvo. Em vez de rearranjar as seqüências gênicas de TCR ou imunoglobulina, essa maquinaria inadvertidamente catalisa eventos de recombinação intercromossômicas que conectam genes de imunoglobulina de forma promíscua com seqüências espalhadas ao longo do genoma, sendo o gene *myc* um destes. Essas raras translocações que envolvem o proto-oncogene *myc* e desregulam sua transcrição parecem conferir vantagens proliferativas especiais nas células, resultando no aparecimento de clones de células e, por fim, em linfomas que carregam essas mesmas alterações cariotípicas características.

Na realidade, muitas outras translocações altamente específicas foram documentadas em diversas malignidades hematopoiéticas (veja, por exemplo, as Tabelas 4.4 e 4.5). Os mecanismos moleculares que levam a essas várias alterações na estrutura protéica permanecem obscuros. Todavia, uma possibilidade muito atraente foi apresentada no Capítulo 10, no qual lemos sobre o colapso de telômeros resultando em ciclos de quebra-fusão-ponte (BFB) (Figura 10.14). Esses ciclos BFB criam aberrações em grande escala nas estruturas de cromossomos individuais, aparentemente atingindo todos os cromossomos com frequência comparável. Em um dado momento, podem ocorrer translocações que fornecem vantagem de crescimento para células que carregam tais cromossomos, o que, pode-se imaginar, resulta em crescimento clonal dessas células portadoras.

Aberrações estruturais superficialmente similares podem ser vistas em diversos tumores hematopoiéticos. Muitas dessas são chamadas *recorrentes*, porque foram encontradas em diversas ocasiões em uma série de tumores surgindo independentemente. Até a data, centenas dessas translocações recorrentes foram catalogadas. Devido ao fato de que translocações recorrentes foram mapeadas em sítios cromossômicos altamente específicos, poderia parecer que os mecanismos moleculares que as criaram são distintos daqueles dos ciclos de quebra-fusão-ponte descritos anteriormente.

Ainda, os mecanismos moleculares que originam essas translocações permanecem obscuros, já que eles ocorrem em tipos celulares hematopoiéticos nos quais as enzimas envolvidas no rearranjo dos genes de imunoglobulinas e dos genes de receptor de células T com uma configuração similar não são expressas. Análises das seqüências do DNA flanqueando pontos de quebra de translocações revelaram duplicações, deleções e inversões de blocos de seqüências, achados que sugerem, mas dificilmente provam, o envolvimento de alguns tipos de mecanismos de reparo de DNA “sujeito a erro”, como a união de extremidades não-homólogas (NHEJ), discutida anteriormente.

Para concluir, no caso de translocações cromossômicas, restam ainda dois mistérios: (1) quais componentes da maquinaria de reparo do DNA estão normalmente prontos para prevenir a formação dessas aberrações estruturais? (2) Como essas anormalidades cromossômicas, uma vez formadas, contribuem para o câncer?

12.12 O cariótipo de células cancerosas é com frequência modificado por meio de alterações no número cromossômico

Segundo o que foi afirmado anteriormente, alguns tipos de instabilidades genéticas afetam o cariótipo alterando o número de cromossomos individuais sem afetar sua estrutura. Tais alterações criam aneuploidia. Enquanto o termo “mutação” está frequentemente reservado

para mudanças na sequência (e, portanto, inclui alterações na estrutura cromossomal), devemos reconhecer o fato de que alterações no número de cromossomos também representam mudanças em um genoma que podem possuir efeitos igualmente profundos no comportamento celular e são, estritamente falando, também um tipo de mutação.

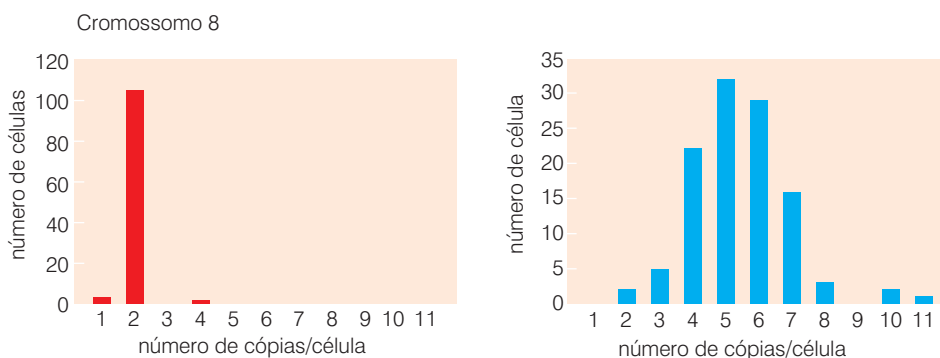
Alterações no número de cromossomos com frequência são criadas em células cancerosas que são afligidas pela condição denominada *instabilidade cromossômica* (CIN). Quando células cancerosas CIN-positivas são removidas de pacientes e propagadas *in vitro*, as consequências de CIN tornam-se evidentes, já que essas células continuam a reorganizar seus complementos de cromossomos durante a propagação em uma placa de Petri. Tais células de câncer já eram bastante aneuplóides quando foram removidas do paciente, e sua instabilidade cariotípica observada *in vitro* é presumivelmente apenas uma extensão da instabilidade comparável que existia *in vivo* durante o curso da tumorigênese (Figura 12.35).

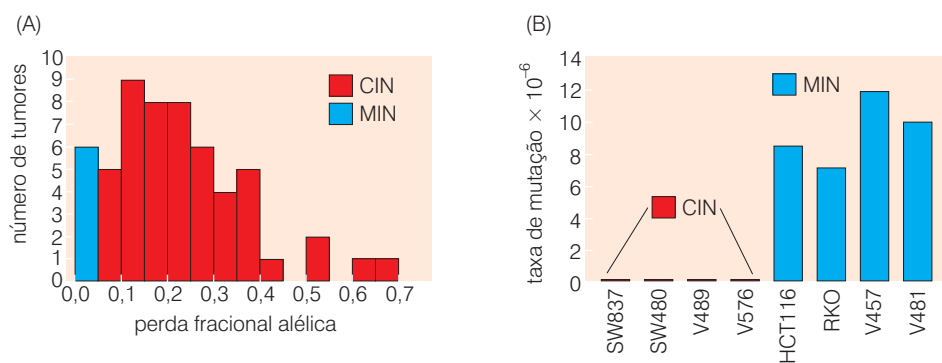
Os cariótipos aneuplóides de células cancerosas podem ser interpretados de duas formas. Um ponto de vista ilustra a aneuploidia como *consequência* do caos geral que progressivamente envolve as células cancerosas à medida que elas avançam em direção a estados altamente malignos. O outro ponto de vista atribui uma importância *causal* à aneuploidia, argumentando que esta é um componente essencial da tumorigênese. Então, alguns discutem que a maioria das células cancerosas necessita da instabilidade cromossômica durante seu desenvolvimento para embaralhar seus genomas e atingir configurações cromossômicas que são mais favoráveis para o crescimento neoplásico. De acordo com esta segunda linha de pensamento, na ausência de mutabilidade aumentada associada à aneuploidia, muitos clones de células incipientes poderiam jamais ter sucesso ao adquirir todas as alterações genéticas necessárias para completar os múltiplos passos da tumorigênese.

Uma importante observação que irá auxiliar a estabelecer esse debate veio do estudo de uma série de carcinomas humanos de cólon e reto. Os poucos tumores que exibem instabilidade de microssatélites (MIN) apresentam relativamente pouca aneuploidia e virtualmente nenhuma instabilidade cromossômica (CIN). Por outro lado, os tumores muito mais numerosos que possuem CIN não são predispostos a apresentarem alterações na sequência de nucleotídeos que são características de MIN (Figura 12.36). Juntas, tais observações sugerem que, ao menos no caso dos carcinomas colorretais, células tumorais devem adquirir mutabilidade aumentada em seus genomas, e que tanto um quanto outro desses mecanismos é suficiente para providenciar tal mutabilidade. Essa conclusão pode iniciar na convicção de que CIN, como MIN, é um mecanismo efetivo para remodelar o genoma celular de uma forma que favorece a evolução em direção a uma neoplasia. Permanece pouco claro se tal lógica é apropriada aos mecanismos genéticos que criam as malignidades hematopoiéticas.

As mudanças no número cromossômico que caracterizam a instabilidade cromossômica são geralmente (e talvez sempre) as consequências da segregação errônea de cromossomos durante a mitose. Durante a fase M normal do ciclo celular, os cromossomos alinham-se em um plano, a *placa metafásica*, e associam-se a fibras do fuso formadas por proteínas de microtúbulo. Juntas, as fibras formam um fuso metafásico. Este, por sua vez, é uma estrutura bipolar

Figura 12.35 A instabilidade cromossômica em células de câncer em cultura O número de cópias do Cromossomo 8 foi medido aqui utilizando-se hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) em células normais (esquerda) e também em células de câncer de mama em cultura (direita) que foram descobertas como sofrendo de instabilidade cromossômica (CIN). Conforme indicado, quase todas as células normais possuíam duas cópias do Cromossomo 8, ao passo que o número de cópias do Cromossomo 8 variou extensivamente em células afetadas por CIN. (Uma distribuição essencialmente idêntica do número de cópias cromossômicas foi observada com o estudo de um segundo cromossomo, arbitrariamente escolhido.) Essa grande variabilidade célula-célula do número cromossômico indica que flutuações desse número continuam a ocorrer com frequência quando tais células cancerosas são propagadas em cultura. (De G.A. Pihan, A. Purohit, J. Wallace et al., *Cancer Res.* 58:3974-3985, 1998.)





na qual cada metade de fuso é constituída de fibras de microtúbulo, muitas das quais se estendem dos **cinetocoros** dos cromossomos (os corpos nucleoprotéicos associados ao DNA centromérico do cromossomo) até os centrossomos; os últimos são responsáveis por organizar toda a estrutura de fibras do fuso metafásico. Quando esse aparato está funcionando apropriadamente, as fibras do fuso separam os pares de cromátides irmãs, de modo que cada cromátide move-se em direção a um dos dois centrômeros. Isso assegura que as duas células-filhas que irão eventualmente surgir após a divisão celular recebem porções precisamente iguais de cromossomos (veja a Figura 8.3B).

Esse processo complexo de segregação cromossômica é monitorado por uma série de controles de pontos de verificação, que garantem, a princípio, que precisamente dois centrossomos e duas metades de fusos se formam; que cada cromátide de um par associa-se com sua própria metade de fuso distinto; e que a separação das cromátides não pode prosseguir a menos que e até que todos os pares de cromátides estejam apropriadamente alinhados na placa metafásica. Quando esses mecanismos de pontos de verificação falham em impor controle de qualidade na segregação cromossômica, ambas as cromátides irmãs de um par podem ser empurradas para um ou outro centrossomo (o processo chamado **não-disjunção**). Como consequência, uma das células-filhas que surge subsequentemente pode tornar-se haplóide para esse cromossomo e triploide para outro. De maneira alternativa, uma cromátide pode falhar ao se conectar a uma fibra do fuso e pode simplesmente ser perdida dos genomas das células descendentes.

Uma situação cariotípica caótica mais disseminada pode ocorrer se os próprios fusos não são apropriadamente montados. Mitoses aberrantes, que resultam da organização inapropriada dos fusos, foram notificadas desde 1890 e, em retrospecto, representaram a primeira pista de que células de câncer são geneticamente anormais. Na **interfase** de células normais, um único centrossomo pode ser visualizado no citoplasma (Figura 12.37A); durante a mitose, dois

Figura 12.36 Instabilidade cromossômica versus mutação gênica A presença de instabilidade cromossômica (CIN) pode ser quantificada pela medida da perda de alelos dos braços cromossômicos. (A) Nos carcinomas colorretais estudados aqui, a análise de um grande número de tumores revelou que muitos tumores sofreram perda de heterozigidade (LOH; veja a Seção 7.4) em um número substancial de locos, cromossomais. Na abscissa, 0,3 de perda alélica, por exemplo, refere-se a tumores nos quais 30% dos locos eram previamente heterozigotos, conforme revelado por análises com marcadores cromossomais, e que agora não mais exibem heterozigidade (*barras vermelhas*). A maioria dessa LOH é atribuída à perda de cromossomos inteiros. Em contraste, entre os tumores afetados com instabilidade de microssatélites (MIN; *barra azul*), a perda de alelos e, portanto, a perda de cromossomos inteiros é insignificante. (B) Em linhagens celulares de tumores colorretais que exibem CIN, conforme estimado pela perda de marcadores cromossomais (veja o painel A), a taxa de inativação do gene *HPRT* (hipoxantina fosforribosiltransferase) é virtualmente zero (*primeiras quatro barras, vermelho*). Em contraste, naquelas que exibem MIN, a taxa de mutação desse gene é significativa e é ocasionalmente 100 vezes mais alta do que em linhagens tumorais CIN (*últimas quatro barras, azul*). (A. de C. Lengauer, K.W. Kinzler and B. Vogelstein, *Nature* 396:643-649, 1998, e B. Vogelstein, E.R. Fearon, S.E. Kern et al., *Science* 244:207-211, 1989; B. de C. Lengauer, K.W. Kinzler and B. Vogelstein, *Nature* 396:643-649, 1998, e J.R. Eshleman, E.Z. Lang, G.K. Bowerfind et al., *Oncogene* 10:33-37, 1995.)

Barra lateral 12.10 Aberrações cromossômicas amplamente espalhadas não estão presentes em todos os tipos de células cancerosas humanas Os cariótipos de células com carcinomas e de células tumorais hematopoiéticas demonstram uma surpreendente discrepância: as células cancerosas epiteliais exibem, quase que invariavelmente, um caos cariotípico, incluindo uma variedade de translocações não-recíprocas, deleções de braços cromossomais e duplicações de outros. Em contraste, os cariótipos de células tumorais hematopoiéticas são diplóides, com a exceção de uma ou duas translocações recíprocas que parecem ser responsáveis por iniciar o câncer ou disparar um passo específico na progressão tumoral (p. ex., o passo que cria o oncogene *BCR-ABL*). Consequentemente, cariótipos caóticos não são necessários para a formação de todos os tipos de malignidades humanas.

É bem provável que o pequeno número de alterações cariotípicas observáveis encontrado na maioria das células cancerosas hematopoiéticas não seja, por si só, suficiente para permitir uma proliferação neoplásica completa. (Em um caso – o da leucemia mielógena crônica – a aquisição do oncogene *BCR-ABL* é frequentemente seguida, durante a crise da recaída brusca, pela perda da função de *p53*; mutações pontuais causam tal perda, e são, obviamente, cariotipicamente invisíveis.) Além disso, células tumorais hematopoiéticas não foram relatadas como sofrendo de instabilidade de microssatélites. Assim, permanece pouco claro por que mecanismos genéticos permitem que as células hematopoiéticas adquiram o repertório completo de alelos mutantes necessários para proliferar como células neoplásicas completas. De fato, sequer sabemos se a formação de tumores hematopoiéticos necessita de tantas mudanças genéticas quanto aquelas necessárias para a formação de tumores sólidos (veja a Seção 11.12).

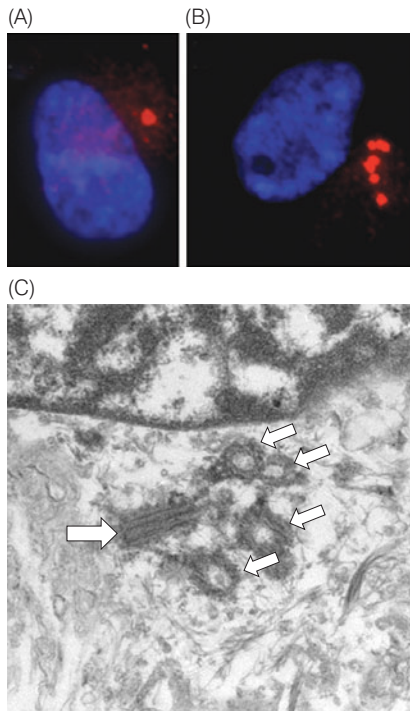


Figura 12.37 Centrosomos e organização do fuso mitótico Centrosomos são responsáveis por organizar as fibras do fuso de microtúbulos na meiose. (A) Em células de interfase imortalizadas, mas não-malignas, a presença de um único centrosomo pode ser detectada no citoplasma pelo uso de um anticorpo que detecta pericentrina, uma proteína associada ao centrosomo (vermelho). Esse centrosomo é geralmente duplicado na transição G_1/S para gerar os dois centrosomos encontrados nos pólos do fuso mitótico. (B) Em contraste, durante a interfase de células de câncer humanas, centrosomos múltiplos podem frequentemente ser observados. Estes com frequência criam fuses multipolares (veja a Figura 12.38) quando tais células entram em mitose. (C) O par de centríolos que forma o centro de cada centrosomo pode ser melhor visto usando microscopia eletrônica de transmissão (TEM), neste caso, de uma célula do carcinoma de cólon humana. Quatro centríolos são vistos aqui em secção transversal (*setas pequenas*), enquanto uma visão lateral de uma quinta célula (*seta grande*) aparece, indicando uma desregulação do número de centríolos. A membrana nuclear é vista acima. (A e B, de G.A. Pihan, A. Purohit, J. Wallace et al., *Cancer Res.* 58:3974-3985, 1998; C, cortesia de M.J. Difilippantonio e T. Ried.)

centrossomos são posicionados em pólos opostos dentro da célula. Células cancerosas, no entanto, frequentemente apresentam defeitos marcantes em sua organização, incluindo múltiplos centrossomos na intérfase (Figura 12.37B e C). O resultado pode ser fuses mitóticos que possuem múltiplos pólos em vez dos dois encontrados em células normais (Figura 12.38A e B) e na divisão do conjunto normal de cromossomos entre três ou mais células-filhas (Figura 12.38C). Como consequência posterior, a má segregação resultante dos cromossomos em células-filhas pode levar a flutuações livres no número de cromossomos e no cariótipo geral. Em uma pesquisa com 87 tumores diferentes, 81 apresentaram anormalidades no número de centrossomos ou na microestrutura de centrossomos individuais; tais defeitos nunca foram encontrados em células normais utilizadas como controle nesses estudos.

Parece que, uma vez que o aparato complexo desenhado para assegurar a segregação apropriada dos cromossomos foi danificado, tal dano é irreversível. Por exemplo, como foi visto na Figura 12.35, a enorme variabilidade célula-célula no número de cópias do Cromossomo 8 em certas células de câncer de mama indicou que a instabilidade cromossômica (CIN) persistiu nessas células muito após a progressão de tumor ter se completado. A respeito disso, CIN difere dos ciclos de quebra-fusão-ponte (BFB) descritos anteriormente (Seção 10.4), pois parece atormentar os genomas de células cancerosas por uma janela temporal limitada durante a progressão de tumor e, então, cessa, uma vez que essas células continuam a adquirir a telomerase e, portanto, estabilizar seus cariótipos.

Recentemente, alguns dos defeitos moleculares que contribuem para vários tipos de instabilidade cromossomal vieram à tona. Não surpreendentemente, a duplicação dos centrossomos é proximamente coordenada com o avanço do ciclo celular; ela parece ocorrer na ou próxima à transição G_1/S . Mais especificamente, uma quantidade crescente de evidências indica que a duplicação dos centrossomos é coordenada de alguma forma pelo complexo das cinases dependentes de ciclina (CDK) contendo as ciclinas E e A (Seção 8.3). De forma provocativa, células de cultura primária (i. e., aquelas que estiveram em cultura apenas por um curto período) nas quais a proteína E7 do papilomavírus humano (HPV) é expressa apresentam uma desregulação no número de centrossomos, o que leva, com frequência, a centrômeros **supranumerários** (extra) além dos dois que em geral estão presentes em células que tendem a entrar em mitose.

Lembre-se que a oncoproteína E7 liga a pRb celular (a proteína do retinoblastoma), inativa-a funcionalmente e acelera sua degradação (Seção 8.5). Significativamente, uma forma mutante da oncoproteína E7 de HPV que falha na ligação à pRb também falha ao induzir o aparecimento de centrossomos extras. Juntas, essas linhas de evidência sugerem que uma das consequências da perda da função de pRb é a desregulação da duplicação dos centrossomos. Já que os centrossomos possuem um papel central na organização dos fuses mitóticos, essa

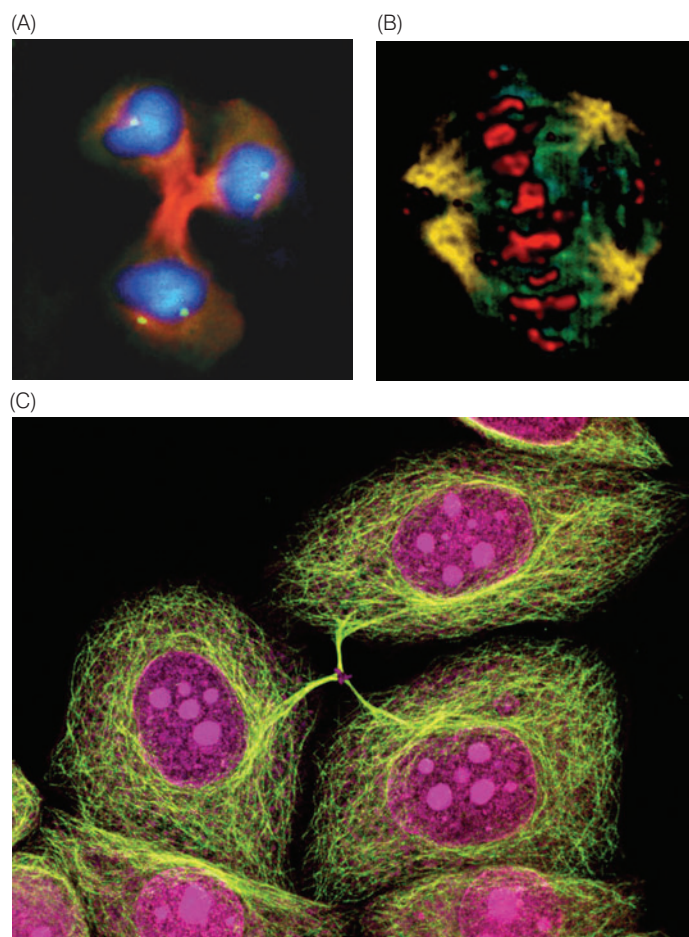


Figura 12.38 Aparatos de mitose multipolar

Em uma metáfase normal de células em cultura, as fibras do fuso mitótico, que são compostas por microtúbulos, estendem-se dos dois centrosomos nos pólos mitóticos até os cinetocoros dos cromossomos – as estruturas proteínicas associadas ao DNA cromossomal centromérico. (A) Nesta micrografia de fibroblasto de embrião de camundongo *p53*^{-/-}, a formação de três centrosomos resultou na formação de um arranjo trirradial dos fusos mitóticos, no qual as fibras do fuso foram imunocoradas em *vermelho* com um anticorpo reativo com α e β -tubulina, ao passo que os aglomerados de cromossomos foram corados em *azul* com DAPI, um corante de DNA. Os três centrosomos são vistos como pequenos *pontos amarelos* que foram imunocorados com um corante reativo com γ -tubulina. Observações como essa implicam *p53* na regulação do número de centrosomos. (B) A presença de fusos multipolares é evidente nestas células humanas de carcinomas orais nas quais quatro centrosomos são ativos. As fibras do fuso foram imunocoradas com um anticorpo antitubulina (*amarelo*). Os cinetocoros, imunocorados em *vermelho*, alinharam-se em uma placa metafásica maior e em outra menor. Regiões de sobreposição entre o DNA cromossomal (corado em *azul* com o corante DAPI, *não-visível*) e as fibras do fuso aparecem em *verde*. (C) Aqui, na citocinese seguindo a telófase, três células-filhas de carcinoma cervical da linhagem HeLa são vistos sendo formados por meio da mitose de uma célula-mãe cujos cromossomos complementares foram divididos. Os microtúbulos, incluindo os da fibra do fuso, foram corados em *amarelo*, e o DNA foi corado em *púrpura*. A abscisão dessas células, ao término da citocinese, não procede de forma adequada. (A, de P. Tarapore and K. Fukasawa, *Oncogene* 21:6234-6240, 2002; B, de W.S. Saunders, M. Shuster, X. Huang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 97:303-308, 2000; C, de K.G. Murti, *BioTechniques*, imagem datada de Outubro de 2004.)

desregulação pode levar a flutuações dramáticas no número cromossômico. De fato, precisamente essa instabilidade cromossômica é observada em linhagens humanas de células de carcinoma cervical, sendo que quase todas estas expressam a região inicial do genoma de HPV, que carrega os genes que codificam as oncoproteínas virais E6 e E7.

Uma contribuição equivalente à aneuploidia pode ser feita pela proteína E6 do HPV e por outros agentes que interrompem a função de *p53*, já que células que não contam com os serviços dessa importante proteína supressora de tumor parecem particularmente suscetíveis a adquirirem genomas aneuplóides. Assim, a oncoproteína E7 de HPV desestabiliza o número cromossômico, enquanto a proteína E6, por meio de suas ações na *p53*, faz com que a célula tolere quaisquer anormalidades cromossômicas que possam eventualmente surgir. Também em uma vasta gama de outros cânceres humanos que não são causados por uma infecção viral, células que perderam a função de *p53* por meio de outros mecanismos apresentam taxas relativamente altas de instabilidade cromossômica em seu número de cromossomos. As precisas conexões da sinalização entre a função de *p53*, pontos de verificação da mitose e o monitoramento do número de cromossomos permanecem obscuras.

A inativação da regulação de pRb pode conferir vantagem proliferativa imediata em uma célula cancerosa incipiente infectada por HPV pela inativação do controle que governa a passagem pela transição do ponto-R (Seção 8.2). A longo prazo, vantagens adicionais podem acumular-se para as descendentes dessa célula, já que o número de centrosomos se tornará desestabilizado, levando, por sua vez, à perturbação dos fusos mitóticos e à resultante desestabilização do cariótipo. As alterações no número de cromossomos que se seguem podem originar uma constelação de genes promotores e retardatários do crescimento em proporções que aceleram a progressão de tumor.

Tabela 12.3 Genes mutados, metilados e superexpressos em células cancerosas que perturbam a estabilidade cromossômica

Gene	Função do produto do gene	Consequência da alteração em células cancerosas
<i>BUB1</i>	Ponto de verificação da montagem do fuso	Progressão por meio da mitose, mesmo na presença de inibidores de microtúbulos ^a
<i>MAD1</i> ^b	Ponto de verificação da montagem do fuso	Aneuploidia em grande escala
<i>MAD2</i> ^{b,c}	Ponto de verificação da montagem do fuso	Entrada prematura na anáfase ^d , aneuploidia
<i>Securina</i>	União das cromátides irmãs	Não-disjunção de cromossomos ^e
<i>ATM</i>	Segregação cromossômica	Transição metáfase-anáfase defeituosa
<i>Aurora-A,-B,-C</i>	Separação das cromátides na anáfase	Entrada prematura na anáfase ^d
<i>CHFR</i>	Ponto de verificação da montagem do fuso	Não-disjunção, perda cromossômica ^e
<i>14-3-3σ</i>	Ponto de verificação do dano ao DNA	Segregação de cromossomos não-reparados

^a Inibidores de microtúbulos, como a colchicina e o nocodazol, bloqueiam a montagem das fibras do fuso mitótico.

^b Mad1 e Mad2 formam complexos no cinetocoro que previnem a separação das cromátides até que complexos com fibras do fuso tenham sido apropriadamente formados.

^c O gene *MAD2* é reprimido em nível de transcrição em diversos tumores sólidos e está freqüentemente mutado em carcinomas gástricos. Camundongos que são heterozigotos para o loco *Mad2* (i. e., são *Mad2*^{+/-}) desenvolvem câncer de pulmão em adultos.

^d A entrada prematura na anáfase pode levar à perda de cromossomos inteiros.

^e A não-disjunção é a falha na separação das cromátides irmãs na anáfase.

A grande complexidade da mitose levanta a questão de quanto esse processo está sujeito a erro e de como muitas proteínas regulatórias, incluindo proteínas de controle de pontos de verificação, são adequadas para monitorar a progressão dos vários passos da fase M. Análises genéticas em leveduras revelaram até 100 genes e proteínas distintas que estão envolvidos nos vários passos da montagem e dinâmica do fuso mitótico, bem como na união e separação dos cromossomos do fuso durante a mitose; mutações em muitos desses genes resultam em instabilidade cromossômica em leveduras. Muitas dessas proteínas são bastante conservadas evolutivamente, e seus homólogos são, provavelmente, componentes da maquinaria mitótica de mamíferos.

Até agora, apenas uma pequena porção de tumores humanos foi identificada como possuindo mutações nos homólogos humanos de genes de levedura sabidamente envolvidos na montagem das cromátides e na sua separação durante a mitose. Alguns exemplos são fornecidos na Tabela 12.3. As funções de alguns desses genes críticos reguladores de mitose podem ser perdidas por meio da metilação de seus promotores (Seção 7.8), mas isso permanece muito pouco documentado. Na verdade, apenas uma pequena proporção do grande grupo de genes envolvidos nas funções mitóticas foi explorada para determinar se o funcionamento desses genes está comprometido durante o curso da progressão de tumor.

Um exemplo de tais genes de controle mitótico é o gene *CHFR*, que codifica uma proteína de ponto de verificação que normalmente previne o avanço da prófase para a metáfase caso os microtúbulos do fuso e os centrossomos não estejam apropriadamente arranjados. O gene que codifica essa proteína de ponto de verificação, que em geral é expresso de forma ubíqua em células humanas, foi encontrado completamente reprimido devido à metilação de seu promotor em 3 de 8 linhagens celulares de câncer aleatoriamente escolhidas e em 7 de 37 biópsias de câncer de pulmão.

Outro regulador-chave da entrada na fase M é a proteína 14-3-3σ. Quando o DNA genômico é danificado, a p53 induz a síntese de 14-3-3σ, que procede para manter complexos de ciclina B-Cdc2 no citoplasma (Seção 9.9); sequestrando esses complexos de ciclina-CDK, a 14-3-3σ obtém sucesso no bloqueio à entrada na fase M, dessa forma deixando a mitose em suspensão até que o DNA cromossomal danificado tenha sido reparado. O gene que codifica a proteína 14-3-3σ também foi, com freqüência, encontrado metilado em cânceres comuns, incluindo os de pulmão, mama, estômago e fígado. A perda resultante de 14-3-3σ pode, certamente, contribuir para a aneuploidia observada nesses tipos de células cancerosas.

Esses dois exemplos, envolvendo as proteínas CHFR e 14-3-3σ, apenas iniciam o preenchimento de lacunas. Claramente existem muitos outros genes *caretakers* a serem descobertos, os

quais possuem papéis críticos na estabilização de seqüências de DNA ou cariótipos e, assim, determinam se a progressão do tumor irá ocorrer lentamente ou proceder de forma acelerada.

12.13 Sinopse e perspectivas

A instabilidade genômica tem sido inerente à ciência da vida desde que as primeiras células apareceram, há 3,5 bilhões de anos. Nesse meio tempo, organismos vivos continuamente batalharam por um balanço entre instabilidade genética muito baixa ou em demasia em seus genomas. Se eles suprimissem muito severamente a taxa na qual as mutações se acumulavam, a evolução darwiniana, que depende diretamente na geração continuada de diversidade genética, seria paralisada. Por outro lado, se eles permitissem que as taxas de mutação aumentassem demais, sua capacidade de reprodução, e mesmo sua viabilidade, estariam seriamente comprometidas. O nível relativamente baixo de instabilidade genética que opera em nossas células – especificamente aquelas da linhagem germinativa – representa um compromisso entre essas duas necessidades conflitantes.

Esse balanço entre muita e pouca instabilidade genética não precisa ser atingido nas células individuais de nossos tecidos somáticos. Nestes, qualquer instabilidade genética – mutabilidade, como já nos referimos a ela – é indesejável, já que abre a porta para a neoplasia. Isso poderia parecer uma explicação de por que a evolução teve de “trabalhar duro” para assegurar que os genomas de nossas células somáticas fossem tão estáveis.

Múltiplas camadas de mecanismos de defesa operam para manter as taxas de mutação somática em níveis extremamente baixos. Em nível biológico, elas são personificadas pela organização das células-tronco e da sua progênie diferenciada. Em nível bioquímico, um grupo de enzimas e uma variedade de espécies químicas de baixo peso molecular são empregadas para confrontar e neutralizar mutágenos antes que eles obtenham sucesso em atingir o genoma. E, caso seja infligido dano, os mutágenos escapem das defesas externas ou devido a erros na replicação do DNA, um grande grupo de enzimas de reparo do DNA – as *caretakers* – está à espera, sempre alerta para aberrações estruturais na dupla hélice e em seus nucleotídeos. Com maior frequência, essas enzimas lidam muito eficientemente com o dano sofrido e restauram o DNA a seu estado prévio, apagando qualquer sinal de que o dano tenha existido. Além disso, um complexo arranjo de proteínas assegura que a mitose e a meiose ocorram apenas quando os cromossomos estão alinhados de forma apropriada na placa metafásica, mantendo, assim, o cariótipo euplóide.

A nossa percepção do DNA e de sua afamada estabilidade é modificada por um entendimento dessas proteínas *caretakers* e de seus múltiplos papéis na manutenção do genoma. Anteriormente, apresentamos o DNA como uma rocha sólida, uma entidade imutável na célula, uma ilha única de estabilidade localizada entre incontáveis outras moléculas que são constantemente formadas e degradadas. Agora, entendemos que essa visão era simplista e ilusória. Como todas as outras moléculas na célula, o DNA é vulnerável a muitos tipos de dano. Sua aparente estabilidade reflete nada mais do que um equilíbrio dinâmico, uma batalha em andamento entre as forças da ordem e do caos. Qualquer estabilidade que o DNA cromossomal exiba, e ela é considerável, representa uma declaração surpreendente do arranjo elaborado de *caretakers* que estão sempre em vigília, prontos para consertar a mais diminuta lesão na dupla hélice.

As implicações disso para o câncer são simples e claras: se a quebra da integridade genômica é um ingrediente essencial na formação de tumores humanos, isso pode surgir prontamente do enfraquecimento da maquinaria de reparo sempre vigilante e de seus controladores.

Nossos encontros iniciais com a quebra da estabilidade genômica vieram do Capítulo 9, no qual aprendemos que a proteína supressora de tumor p53 é ocasionalmente chamada “guardião do genoma”, já que células que não possuem a função de p53 adquirem uma série de defeitos genéticos a uma taxa elevada. Em grande parte, tal mutabilidade aumentada, que

inclui alterações na sequência de DNA, bem como mudanças no cariótipo, não reflete o papel de p53 na manutenção direta do genoma. Em vez disso, a perda da função de p53 cria um ambiente que é permissivo para a sobrevivência de células mutantes. Neste capítulo, modificamos nosso foco fazendo uma pergunta diferente, que foi além da ativação da p53: se a perda da p53 permite que células mutantes (e altamente mutáveis) sobrevivam, como, precisamente, as mutações adquiridas por tais células surgem pela primeira vez?

Essas mutações ocorrem freqüentemente durante a progressão de tumor, e a elevada mutabilidade é cada vez mais aceita como um elemento essencial da patogênese do câncer. Conforme mencionado no início deste capítulo, de uma proposta feita em 1974, o abandono do estado altamente estável do DNA é essencial para a formação de cânceres humanos. Essa proposta surgiu dos cálculos das taxas nas quais as mutações se acumulavam em células normais e em uma estimativa do número de alterações genéticas necessárias para que o tumor progredisse e alcançasse a compleção.

Sem essas taxas de mutação aumentadas – era o que se pensava – os intervalos de tempo entre sucessões clonais (veja a Seção 11.5) seriam muito maiores. Na realidade, as leituras dos capítulos anteriores, juntamente com este, sugeriram ao menos duas formas alternativas pelas quais a sucessão clonal poderia ser acelerada durante a progressão de múltiplas etapas de um tumor. Promotores de tumor (incluindo processos endógenos, como inflamação) podem comprimir o tempo entre duas sucessões clonais; alternativamente, a aceleração poderia ser alcançada pela desestabilização do genoma, como descrito neste capítulo. Devido ao fato de que esses dois processos em geral ocorrem concomitantemente, a modelagem matemática da progressão tumoral torna-se muito difícil.

Agora entendemos que as análises matemáticas de 1974 dependiam de tantas conjecturas quantitativas que a sua maior predição representou pouco mais do que uma especulação inspirada. Como quase sempre é o caso da biologia, as observações de sistemas vivos falavam mais alto do que a teorização. Durante as três décadas que se seguiram, um conjunto diverso de observações experimentais forneceu um forte suporte, na verdade uma validação, de tal especulação. Agora sabemos que a instabilidade genética está muito bem-espalhada em cânceres humanos. A evidência acumulada indica que a desestabilização do genoma é um ingrediente essencial na criação de quase todas as células de tumores humanos que surgem no corpo humano. Na verdade, a instabilidade genética é tão comum em tumores humanos que podemos incluí-la entre um dos marcos do câncer – a lista de tratamentos celulares que, juntos, definem virtualmente todos os outros tipos de malignidades.

Anos após a instabilidade genética ser predita como possuindo um papel crítico na progressão tumoral, houve uma descoberta biológica que pode fornecer suporte adicional para tal idéia. No capítulo anterior, lemos extensivamente sobre o papel de populações de células-tronco de tumores de mama que atuam, como células-tronco de tecidos normais, populando massas tumorais com células neoplásicas de potencial replicativo limitado (Seção 11.6). Outro trabalho estendeu esse paradigma para incluir tumores humanos de cérebro e gastrintestinais, e parece provável que essas organizações hierárquicas de células-tronco e da progênie amplificadora transitória estejam presentes em muitos tipos de tumores humanos.

Em muitos tumores, essas células similares a células-tronco constituem apenas uma pequena porção da população geral de células cancerosas; ainda assim, elas parecem estar engajadas na transmissão do genoma celular do tumor – a linhagem germinativa do tumor – para as gerações futuras de células cancerosas. Como consequência, as mutações que dirigem a progressão de tumor nas mamas e no cérebro, e, possivelmente, em qualquer outro local, devem atacar os genomas dessas células relativamente raras. (Por outro lado, mutações que atingem células, na massa tumoral, que não são células-tronco, principalmente as células amplificadoras transitórias, não irão, de forma geral, ser produtivas para a progressão tumoral, já que tais células possuem um potencial replicativo limitado. Uma possível exceção aqui podem ser aquelas mutações, se é que elas existem, que atingem células amplificadoras transitórias e conferem uma capacidade ilimitada de auto-renovação a elas.)

Se a maior parte das mutações que contribuem para o desenvolvimento do câncer são limitadas àquelas que atingem células-tronco, isso determina que a taxa de mutação efetiva (mutações acumuladas por divisão celular) durante a progressão tumoral deve ser muito maior do que o imaginado previamente. Lembremo-nos de que cálculos anteriores assumiram que todas as células pré-malignas em uma massa tumoral eram igualmente qualificadas, uma vez mutadas, a tornarem-se as progenitoras de novas células malignas, que seriam clones bastante evoluídos (veja a Figura 11.12).

Uma medida crua da extensão real da desestabilização genômica em células cancerosas é fornecida por observações de que, além de seu papel normal na eliminação de células mutantes, p53 também desempenha um papel direto de apoiar a manutenção genômica: células negativas para p53 parecem possuir um reparo por excisão de nucleotídeos (NER) globalmente defeutivo. Dada a ocorrência amplamente distribuída da inativação do gene *p53* em quase metade de todos os tumores humanos e na desregulação da via da p53 na maioria dos restantes, isso sugere que uma alta percentagem de neoplasmas humanos não possuem ao menos um tipo de NER. De maneira importante, essa perda parcial da capacidade de reparo provavelmente representa apenas um dentre uma série de outros defeitos na manutenção do genoma que as células negativas para *p53* adquirem durante sua longa marcha em direção à malignidade. (Além disso, evidências acumuladas indicam que duas primas da p53, p63 e p73, que com frequência colaboram com a p53 para formar complexos multi-subunidade de fatores de transcrição, também são responsáveis pela indução da expressão de genes que codificam certas proteínas de reparo de DNA.)

As alterações submicroscópicas na estrutura do genoma que são criadas por BER e NER defectivas – demasiado pequenas para afetar o cariótipo de células cancerosas – são compostas pelo embaralhamento generalizado da estrutura cromossomal, e, portanto, do cariótipo, encontrado em células da grande maioria dos tumores sólidos. Na Seção 10.4, vimos que a erosão telomérica é a provável responsável por muita dessa instabilidade, devido à sua capacidade de desencadear ciclos de quebra-fusão-ponte. Ao mesmo tempo, aprendemos que esse caos cromossomal também contribui para que a progressão tumoral avance.

Uma medida quantitativa da extensão desse caos é fornecida pela técnica da hibridização genômica comparativa (CGH; Figura 11.20), que mede o número de cópias de diferentes segmentos de DNA cromossomal e, assim, de braços cromossômicos. Conforme mostrado na Figura 11.21, o genoma de um único câncer de mama humano apresenta flutuações substanciais no número de cópias de segmentos cromossômicos individuais; esses perfis CGH variam dramaticamente de um tumor para outro. No entanto, essas excursões de um número normal de cópias não são aleatórias: quando os perfis de um grande número de cânceres de mama independentemente analisados foram utilizados para o cálculo de uma média, certas alterações recorrentes no número de cópias de segmentos cromossômicos tornaram-se aparentes (Figura 12.39). Já que tais alterações são vistas em diversos tumores que surgiram

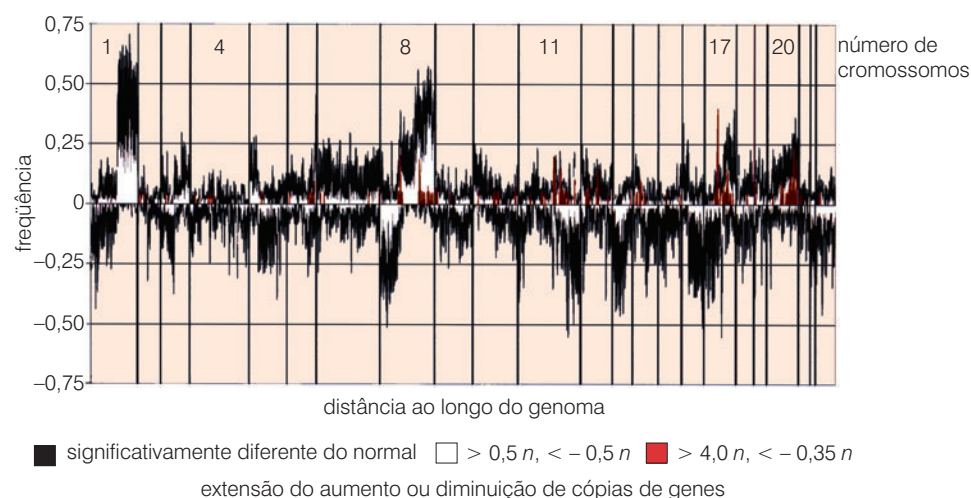


Figura 12.39 Análise por hibridização genômica comparativa de genomas de câncer de mama O genoma de uma célula de câncer de mama humano pode exibir flutuações no número de cópias de vários segmentos cromossomais e genes associados. A técnica da hibridização genômica comparativa (CGH) torna possível comparar os números de cópias de segmentos cromossomais relacionados presentes no DNA humano normal (veja a Figura 11.20). A análise por CGH de cada genoma de câncer de mama humano fornece um perfil distinto de ganhos e perdas; no entanto, uma média dos padrões de perfis de CGH de um grande número de cânceres de mama, como mostrado aqui, revela que ganhos e perdas de segmentos cromossomais particulares estão presentes em múltiplos tumores e são, por consequência, recorrentes. A proporção de tumores que demonstram vários graus de amplificação ou perda (*ordenada*) é analisada em função da distância no genoma (*abscissa*), movendo-se para a direita do Cromossomo 1. As proporções dos cânceres de mama apresentando um número anormalmente grande de cópias foram empregadas como valores positivos, enquanto as proporções apresentando um número anormalmente baixo de cópias foram empregadas como valores negativos. As linhas verticais indicam limites cromossomais. Os valores mostrados em *preto* demonstram a proporção de tumores nos quais o número de cópias de uma região cromossômica é significativamente diferente da média. Os valores mostrados em *branco* demonstram a proporção de tumores nos quais o número de cópias é 50% maior ou menor do que a média. Os valores mostrados em *vermelho* representam frequências de tumores para os quais o número de cópias é quatro vezes maior do que o da média (i. e., altamente amplificados) ou menos de 35% da média (i. e., mais do que uma cópia do genoma tumoral foi perdida). Neste caso, a “média” é o número de cópias esperado de um gene, dada a ploidia geral do genoma de câncer de mama que estava sendo estudado. Assim, segmentos dos Cromossomos 1 e 8 foram repetidamente encontrados amplificados nesses cânceres, ao passo que segmentos dos Cromossomos 8, 11, 13, 16 e 17 estavam frequentemente deletados. (Cortesia de K. Chen e J.W. Gray.)

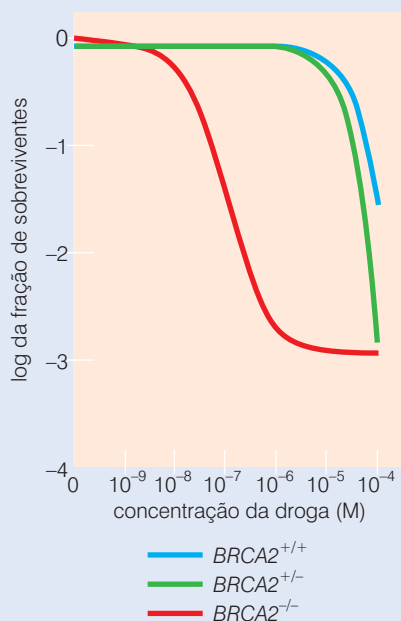
independentemente, elas são, presumivelmente, vantajosas para a proliferação de células cancerosas, mas ainda estamos longe de saber precisamente por que.

A mutabilidade adquirida dos genomas de células cancerosas é uma “faca de dois gumes”, já que coloca as células cancerosas em uma condição de risco: os resultantes erros frequentes na replicação e na segregação cromossomal tornam tais células especialmente vulneráveis à morte, devido a defeitos letais não-reparados em seus genomas. De fato, é possível que muito da regressão de células cancerosas que ocorre durante cada geração celular (veja a Figura 10.5) se deva às frequentes catástrofes genômicas que são incompatíveis com a continuação da sobrevivência celular. Além disso, células cancerosas podem ser expostas a um segundo perigo devido a seu aparato de reparo de DNA defeitivo: elas podem ser especialmente suscetíveis a certas formas de quimioterapia (Barra lateral 12.11).

O fato de que células diplóides cancerosas humanas podem ser criadas experimentalmente por meio da introdução de um grupo específico de genes clonados (Seção 11.12) indica que a miríade de alterações cromossômicas presentes em muitas células cancerosas não é essencial para a proliferação neoplásica se forem fornecidas as combinações apropriadas de elementos genéticos a uma célula, incluindo proto-oncogenes e genes supressores de tumor, ambos mutantes. Isso pode significar que apenas uma pequena proporção das centenas de milhares de alterações presentes em muitos genomas de células cancerosas humanas realmente possui papel causal no processo da tumorigênese. Assim, podemos especular o seguinte: que a mutação de um pequeno número de genes controladores críticos é uma forma de adquirir um fenótipo neoplásico; o embaralhamento de genomas, como revelado pela hibridização comparativa de genomas, é outra. Uma combinação das duas estratégias parece ser uma rota escolhida pela maioria das células de cânceres humanos durante a progressão tumoral múltiplas etapas.

Ainda sabemos relativamente pouco sobre o momento durante a progressão de tumor múltiplas etapas no qual a mutabilidade aumentada é adquirida pela primeira vez. A desestabiliza-

Barra lateral 12.11 Certas drogas quimioterapêuticas podem possuir toxicidade seletiva para células cancerosas que não possuem sistemas de reparo de DNA competentes. Muitos tratamentos anticâncer em desenvolvimento aproveitam-se da incapacidade de muitos tipos de células cancerosas de reparar apropriadamente ou manter seus genomas. A enzima PARP1



(poli[ADP-ribose] polimerase) facilita o reparo de DNA ligando-se a quebras no DNA, atraindo, dessa forma, outras proteínas de reparo. Camundongos *Parp1*^{-/-} são viáveis e férteis, indicando sistemas de reparo de DNA redundantes; isso explica por que inibidores farmacológicos de PARP possuem pouco ou nenhum efeito em tecidos normais.

Células que não possuem a função de BRCA1 ou BRCA2 parecem sobreviver dependendo de PARP e seus colaboradores como sistema reserva para manter seus genomas em algum nível mínimo de integridade por meio de HDR. Esse tipo de reparo parece ser particularmente crítico na restauração do genoma após quebras acidentais que ocorrem nas forquilhas de replicação durante a fase S (veja a Figura 12.10). Como consequência, células que não possuem a função de BRCA1 ou BRCA2 foram encontradas como altamente sensíveis à morte por inibidores farmacológicos de PARP1 (Figura 12.40). Já que esses inibidores possuem relativamente pouco efeito em células normais, derivados químicos deles podem algum dia ser úteis como agentes citotóxicos altamente seletivos para o tratamento de tumores de mama que não possuem as funções tanto de BRCA1 quanto de BRCA2.

Figura 12.40 Morte de células negativas para BRCA2 por uma droga anti-PARP. A dependência de células de câncer de mama humanas que não possuem BRCA1 e BRCA2 em uma via de HDR redundante mediada por PARP pode tornar essas células especialmente vulneráveis à morte por uma droga anti-PARP. Aqui, células ES (tronco embrionárias) de camundongo de três genótipos foram tratadas com KU0058948, um inibidor de PARP. Enquanto as células ES $BRCA2^{+/+}$ (azul) e $BRCA2^{+/-}$ (verde) foram mortas apenas por concentrações muito altas da droga (abscissa), as células ES $BRCA2^{-/-}$ foram mortas pela droga em concentrações até mil vezes menores (vermelho). (De H. Farmer, N. McCabe, C.J. Lorde et al., *Nature* 434:917-921, 2005.)

ção genômica pode ocorrer cedo no desenvolvimento de alguns cânceres e bastante tarde durante o desenvolvimento de outros. Por exemplo, a instabilidade cromossômica é frequentemente detectável cedo na progressão de tumor de cólon, já estando presente em muitos pólipos adenomatosos pequenos. A consequência imediata, podemos imaginar, é uma aceleração de muitos dos passos subsequentes na progressão de carcinoma de cólon.

Esse cenário de instabilidade genética parece criar um dilema lógico. Quase todas as alterações genéticas que ocorrem durante a progressão tumoral parecem conferir algum benefício imediato para o crescimento ou sobrevivência para as células que as adquiriram. Muitos dos capítulos anteriores deste livro documentaram as vantagens de crescimento específicas resultantes de cada uma dessas alterações. Essa dinâmica fez com que especulássemos que a progressão tumoral é um processo análogo à evolução darwiniana (Seção 11.5). Porém, ao contrário de muitas características adquiridas por células cancerosas, a instabilidade genômica, uma vez adquirida por uma célula, não fornece nenhuma recompensa – uma vantagem importante para proliferação ou sobrevivência. Em vez disso, a aquisição desse traço representa um investimento “a longo prazo”, ou seja, o benefício será obtido apenas por células descendentes distantes dessa célula.

Podemos entender tal vantagem a longo prazo da seguinte forma. Clones de células que adquiriram algumas das alterações genéticas iniciais que levam ao câncer parecem surgir com grande frequência ao longo dos tecidos no corpo. A vasta maioria dessas células permanece em um estado dormente, pré-maligno, por um período correspondente a uma vida inteira, não representando uma ameaça ou obstrução, já que seus genomas estáveis impedem a aquisição de mutações adicionais que iriam tornar essas células clones realmente perigosas. Em uma ocasião rara, porém, uma célula em um ou outro desses clones já iniciados adquire uma alteração em um de seus genes *caretakers*. Agora, pela primeira vez, essa célula e seus descendentes têm a oportunidade de “jogar” com seus genomas, testando novas combinações de elementos genéticos e seqüências novas, algumas das quais irão permitir que a célula avance em direção à longa estrada da progressão tumoral.

Para ter certeza, agentes adicionais, incluindo promotores de tumor e mutágenos exógenos, aceleram mais a taxa na qual essa marcha ocorre. Novamente, a desestabilização adquirida de genomas parece desempenhar um papel crítico no desenvolvimento da maioria dos tumores humanos abrindo a porta para mudanças genéticas. Em resumo, clones de células que serão cancerosas que adquirem a instabilidade genômica estão destinadas, ao longo do tempo, a prosperar, ao passo que suas parceiras, não possuindo tal instabilidade, provavelmente permanecerão intactas e indiferentes por décadas.

Conforme aprendemos neste capítulo, uma variedade de síndromes familiares de câncer são atribuíveis à herança de formas mutantes de genes que especificam importantes componentes de seu aparato de reparo de DNA. A instabilidade genômica ou uma tendência em direção à instabilidade genômica já está implantada nas células de tais indivíduos geneticamente afetados. Nesses casos, a instabilidade genética não é um atributo adquirido – ao contrário da situação que ocorre na maioria dos cânceres humanos.

Em algumas ocasiões, como em muitos dos subtipos de xeroderma pigmentoso (XP), ambas as cópias de um gene crítico para o reparo de DNA são herdadas na forma defectiva. Esse estado de nulizigossidade deixa todas as células da pele desprovidas de meios de lidar com a formação de dímeros de pirimidina induzidos por UV. Em outros casos, como no câncer hereditário de cólon sem polipose (HNPCC), um indivíduo herda uma cópia defectiva de um gene de reparo de pareamento errôneo, e a cópia remanescente é então descartada em várias células somáticas por meio de um evento de perda de heterozigossidade (LOH).

As síndromes familiares de câncer que foram identificadas até agora, incluindo aquelas envolvendo defeitos herdáveis no reparo do DNA, refletem as ações de alelos de linhagem germinativa fortemente penetrantes. Tais alelos asseguram que indivíduos que os carregam irão, com grande probabilidade, manifestar sinais claros de doença em algum ponto de suas vidas. No entanto, as síndromes familiares conhecidas podem representar apenas a ponta de um *iceberg*

muito grande. Então, uma variedade menos penetrante dos alelos mutantes dos genes envolvidos na manutenção do genoma podem estar espalhados no conjunto de genes humanos. Cada um desses alelos pode conferir um pequeno risco aumentado de câncer, mas tal aumento não é claramente aparente ao estudarmos famílias e suas suscetibilidades a vários tipos de câncer. Como consequência, uma porção significativa de muitos tipos de tumores humanos que ocorrem comumente, como câncer de mama, podem estar associados à herança desses alelos de linhagem germinativa ainda desconhecidos.

Nosso pensamento acerca de síndromes familiares de câncer associadas à herança de genes *caretakers* defectivos é confundido por um grande mistério: a maioria dessas doenças envolve apenas um limitado grupo de tecidos no corpo, apesar de termos motivos para acreditar que a atuação de *caretakers* afetados seja necessária de forma ubíqua. Por que, por exemplo, defeitos herdados de pareamento errôneo possuem forte preferência por causar tumores no trato intestinal? O quebra-cabeças é ainda mais complexo no caso do câncer de mama. De acordo com uma estimativa, defeitos herdados em até sete genes que estão envolvidos, direta ou indiretamente, na manutenção da integridade genômica geram riscos substancialmente aumentados de tumores de mama em humanos. Tais genes incluem *BRCA1* e *BRCA2*, dois genes que codificam proteínas associadas a *BRCA1* (*BARD1* e *BACH1*), *CHK2*, *p53* e *ATM* (que especifica um dos sensores de cinase que ativa o alarme da *p53* após o dano ao DNA; Seção 9.6).

Obviamente, essa não é a primeira vez que nos deparamos com um “quebra-cabeça” desse tipo. Lembre-se, por exemplo, do comportamento de alelos mutantes herdados do gene do retinoblastoma, *Rb*. Tal gene especifica uma proteína, pRb, que parece atuar em quase todos os tipos celulares do corpo como a reguladora crítica do avanço por meio do ciclo celular; crianças que herdaram alelos defectivos de *Rb* são predispostas, peculiarmente, a raros tumores nos olhos quando são muito jovens e a tumores ósseos quando adolescentes (Seções 7.3 a 7.5).

Até agora, nossas percepções sobre os genes que são responsáveis pela manutenção do genoma de mamíferos foram forjadas grandemente pela genética de bactérias e leveduras. Tais disciplinas identificaram uma variedade de genes que são essenciais para a manutenção do genoma nesses micróbios e, por extensão, em nossos genomas também. Por exemplo, a lógica entre a genética de fungos, a descoberta de genes de reparo de pareamento errôneo nestes e a síndrome HNPCC levaram à rápida enumeração de seis genes humanos e proteínas que são responsáveis por esse tipo de manutenção genômica (veja a Barra lateral 12.8).

Essas duas linhas de genética de micróbios podem ter conectado apenas uma porção dos genes no genoma humano que são responsáveis pela manutenção de sua integridade. O quão grande, porém, é o universo dos genes *caretakers* humanos e proteínas? O sequenciamento do genoma de levedura começou a dar uma pista para tal número. Estimativas recentes indicam que esse genoma consiste em aproximadamente 5.600 genes distintos. Destes, 153 são classificados como estando envolvidos na replicação e reparo de DNA, enquanto 88 parecem estar envolvidos exclusivamente com o reparo. O fato de que muitos dos genes encontrados neste capítulo são invenções de metazoários sugere que o tamanho do conjunto de genes humanos envolvidos nesses processos seja muito maior. De fato, em 2001, mais de 130 genes de reparo de DNA já haviam sido identificados no genoma humano; em 2004, o número se aproximava de 150. Os genes e proteínas que desempenham papéis críticos na manutenção do genoma e na supressão do câncer estão sendo continuamente descobertos, alguns em locais muito inesperados (Barra lateral 12.12).

Defeitos na maquinaria que protege o genoma de dano serão, algum dia, explorados com interesse oncológico para o desenvolvimento de quimioterapias anticâncer novas e altamente efetivas. Por exemplo, na Barra lateral 12.5, lemos que níveis de certas enzimas detoxificantes, como a glutathione-S-transferase (GST), provavelmente influenciam a responsividade do tumor de um paciente a vários tratamentos quimioterápicos, detoxificando as moléculas quimioterapêuticas antes de elas possuírem uma chance de atacar seus alvos desejados.

Barra lateral 12.12 As histonas atuam na redução do risco a câncer

Por muitas décadas, as histonas e os nucleossomos que elas formam foram tratados como componentes estruturais estáticos da cromatina que servem para empacotar e compactar o DNA cromossômico. A partir de 1990, tornou-se claro que a modificação covalente de histonas é crítica para tornar regiões da cromatina mais ou menos hospitaleiras para a transcrição. Ainda mais recentemente, as histonas foram descobertas como desempenhando um papel dinâmico no reparo de DNA. H2AX é uma variante da histona abundante H2A que está presente em virtualmente todos os nucleossomos. A H2AX constitui 15% das histonas similares a H2A e substitui a H2A em cromossomos esparsos ao longo da cromatina. Quando uma quebra dupla-fita de DNA é mantida em uma fita de DNA cromossômico, moléculas de H2AX (mas não de outras histonas) tornam-se fosforiladas, principalmente pelas cinases ATM e ATR, em um resíduo específico de serina localizado quatro resíduos de aminoácidos da extremidade carboxiterminal dessas moléculas; tal H2AX fosforilada é observada em uma grande região cromossômica (envolvendo até duas megabases de DNA) flanqueando a quebra (Figura 12.41). (Essas duas cinases também são responsáveis por fosforilarem e, assim, mobilizarem p53; Figura 9.13.) A H2AX fosforila-

da resultante (algumas vezes chamada γ -H2AX) serve para atrair proteínas de reparo de DNA, como BRCA1 e NBS1, bem como ao menos quatro outras proteínas que auxiliam na tarefa de re-junção de extremidades de DNA (veja também a Figura 2.30).

Camundongos que perderam o gene H2AX (devido à inativação desse gene na linhagem germinativa de camundongo) são viáveis, mas possuem crescimento diminuído. Suas células são incapazes de executar o reparo dirigido por homologia (Seção 12.10) e são propensas a acumular cromossomos estruturalmente anormais. Camundongos que não possuem as proteínas H2AX e p53 são altamente suscetíveis tanto a tumores hematopoiéticos como a sólidos. Mesmo camundongos que não possuem uma cópia do gene H2AX no contexto da deficiência da p53 apresentam taxas significativamente aumentadas de linfomas.

Essas respostas ilustram o quão altamente complexos são os processos de reparo de DNA, e também como defeitos em quaisquer de seus componentes individuais – muitos ainda não identificados – abrem a porta para o aparecimento de câncer. Provocativamente, o gene humano *H2AX* foi mapeado em uma região cromossômica que frequentemente sofre perda de heterozigotidade e/ou deleção, criando a possibilidade de que esse gene e a histona codificada sejam com frequência desligados por células humanas em rota para a malignidade.

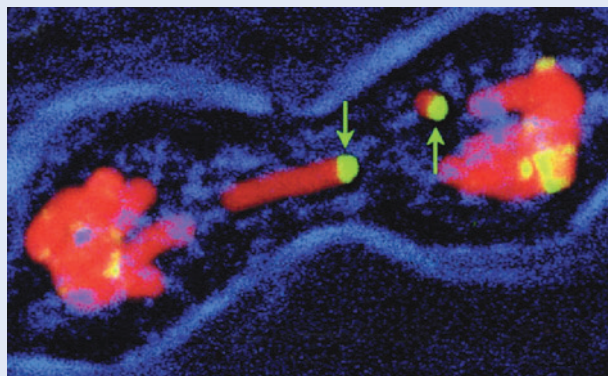


Figura 12.41 γ -H2AX e quebras dupla-fita no DNA A criação de quebras dupla-fita no DNA por vários mecanismos resulta na fosforilação da histona H2AX (uma forma variante da histona H2A), resultando na γ -H2AX. Como H2A, H2AX participa na formação dos nucleossomos. Regiões do cromossomo que flanqueiam a quebra dsDNA e podem compreender até uma megabase de DNA são encontradas por carregarem γ -H2AX (veja também a Figura 12.30B). Na ausência de H2AX, proteínas críticas para o reparo de DNA, incluindo Nbs1 e Brca1, falham no recrutamento para o local da quebra dsDNA. Na imagem mostrada aqui, células do cervídeo muntjac indiano, utilizadas devido ao seu baixo número de cromossomos, foram irradiadas com uma dose pequena (0,6 Gy) de raios X. Células em anáfase tardia foram então coradas para γ -H2AX (amarelo, verde, setas) e para DNA cromossômico (vermelho). Os contornos das células em divisão podem ser vistos em azul. Note a coloração de γ -H2AX nas extremidades rompidas de um cromossomo. (De E.P. Rogakou, C. Boon, C. Redon and W.M. Bonner, *J. Cell Biol.* 146:905-916, 1999.)

Enzimas de reparo de DNA também influenciam, provavelmente, a eficácia de regimes quimioterapêuticos. Pegue, por exemplo, a enzima DNA alquiltransferase (MGMT; Seção 12.8). Conforme lemos anteriormente, tumores colorretais e gliomas frequentemente utilizam a metilação de promotores para interromper a expressão dessa enzima; sua perda parece permitir que seus genomas ganhem mutabilidade aumentada, já que eventos de alquilação podem ocorrer com frequência na vida de uma célula como subprodutos das ações de moléculas como S-adenosilmetionina (SAM). Muitos agentes quimioterápicos também agem por meio de sua capacidade de alquilar bases guanina no DNA – precisamente a modificação que é revertida pela enzima MGMT. De fato, camundongos geneticamente privados dessa enzima são hipersensíveis a níveis bastante baixos desses agentes alquilantes quimioterapêuticos e podem morrer ou envelhecer prematuramente após a exposição; por outro lado, camundongos que superexpressam MGMT são resistentes aos efeitos dessas drogas. Isso sugere que, no futuro, o interesse dos oncologistas no tratamento de tumores como gliomas e cânceres colorretais irá verificar os níveis de MGMT expressos pelas células tumorais para escolher as formas mais efetivas de quimioterapia.

Essa área na pesquisa do câncer também está exercendo um efeito profundo em nosso conhecimento de outro processo biológico, aparentemente não-relacionado, o envelhecimento. Ao menos dez síndromes distintas de envelhecimento precoce – diferentes formas de **progeria** – têm sido ligadas a defeitos herdados em um ou outro componente do sistema de reparo de DNA. Indivíduos que sofrem de tais síndromes com frequência apresentam muitos dos fenótipos do envelhecimento quando atingem a adolescência. Esses efeitos clínicos do reparo defeutivo de DNA fornecem evidências convincentes de que muito do processo natural de envelhecimento será um dia traçado até os danos genéticos que acumulamos em nossas células ao longo da vida. Conseqüentemente, o câncer e o envelhecimento podem ser descobertos compartilhando uma raiz comum – a deterioração progressiva de nossos genomas conforme ficamos mais velhos. Tanto o desenvolvimento de câncer quanto o envelhecimento podem, um dia, ser evitados por tratamentos e estilos de vida que protegem nossos genomas dos ataques sucessivos que eles sofrem, década após década, dentro de nossas células.

Conceitos-chave

- A integridade estrutural, e, portanto, a baixa mutabilidade do DNA, dependem de um grande e complexo grupo de mecanismos biológicos e bioquímicos que trabalha para assegurar que mutações somáticas acumulem-se a taxas muito baixas nos tecidos.
- Alguns dos mecanismos dependem da organização dos tecidos, nos quais as células que vivem mais (as células-tronco) são protegidas do dano genético, ao passo que as células de vida curta (as células amplificadoras transitórias e as células diferenciadas) são vulneráveis a apresentarem tais danos, mas são logo descartadas.
- Bases incorporadas erroneamente geradas por erros na replicação do DNA podem contribuir para o fardo do acúmulo de mutações. Os números dessas alterações são mantidos baixos pelas baixas taxas de erro das DNA polimerases, juntamente com um arranjo de proteínas corretoras de erro, como aquelas envolvidas no reparo de pareamento errôneo. Defeitos herdados nas proteínas de reparo de pareamento errôneo podem levar à suscetibilidade aumentada a certos tipos de câncer, principalmente câncer hereditário de cólon sem polipose.
- Genomas celulares estão sob ataque constante por uma variedade de moléculas quimicamente reativas, muitas das quais derivam do processo celular da fosforilação oxidativa e das espécies reativas de oxigênio que são geradas como subprodutos desse processo. Os genomas celulares também podem sofrer alterações químicas espontâneas, que afetam as bases do DNA a uma taxa baixa, porém significativa.
- Além disso, o DNA genômico de células pode ser atacado por moléculas mutagênicas de origem externa. Tais xenobióticos e seus derivativos quimicamente reativos podem vir de poluentes e, principalmente, de alimentos comumente consumidos.
- As células tentam detoxificar muitos desses compostos antes que eles possam atacar o DNA genômico. Porém, os subprodutos dessas reações podem ser, na realidade, ainda mais reativos e mutagênicos do que as espécies moleculares inicialmente introduzidas.
- Se o ataque de agentes mutagênicos obtém sucesso em danificar o DNA, um grupo elaborado de proteínas envolvidas no reparo por excisão de bases e no reparo por excisão de nucleotídeos fica à espera para remover a grande maioria das bases danificadas. Defeitos herdados nas proteínas do reparo por excisão de bases podem levar à suscetibilidade ao câncer – especialmente ao xeroderma pigmentoso.
- Outros tipos de danos ao DNA incluem quebras dupla-fita no DNA, que podem ser criadas por raios X ou, mais comumente, pela quebra do DNA nas forquilhas de replicação.
- Quebras dupla-fita no DNA podem ser reparadas na fase G1 do ciclo celular pela união de extremidades não-homólogas ou nas fases S e G2 pelo reparo dependente de homologia. Defeitos herdados no reparo do DNA dupla-fita podem explicar a suscetibilidade a cânceres de mama e ovário entre pacientes que herdaram alelos mutantes de linhagem germinativa de *BRCA1* ou *BRCA2*.
- Os genomas podem ser embaralhados por mecanismos que afetam o cariótipo das células. Uma classe de tais alterações inclui aquelas que afetam a estrutura cromossômica, incluindo as translocações que são criadas pela fusão de braços cromossômicos não-rela-

cionados uns aos outros. Tais fusões parecem ser comumente desencadeadas por telômeros erodidos ou por quebras dupla-fita no DNA.

- Alterações no número cromossômico também são comuns em genomas de células cancerosas que parecem facilitar a acumulação de genes em proporções que favorecem a proliferação e sobrevivência dessas células neoplásicas. Muitas dessas alterações derivam de defeitos no aparato mitótico e seus reguladores, principalmente os centrôsomos.
- Sem uma quebra dos vários mecanismos que são responsáveis por manter a integridade do genoma, é provável que a taxa de mutação seja bastante lenta, de forma que genomas celulares acumulem-se para constituir as mudanças genéticas necessárias para que a progressão tumoral adquira compleção.

Questões elaboradas

1. Que tipos de evidências sugerem que alterações no cariótipo dos genomas celulares não são absolutamente essenciais para a transformação neoplásica?
2. Ao calcularmos as taxas de mutação requeridas para que a progressão tumoral múltiplas etapas alcance compleção, que parâmetros devemos saber para que tal cálculo descreva corretamente o verdadeiro processo biológico?
3. Como o nosso entendimento dos processos defectivos no reparo de DNA em células tumorais torna possível o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas anticâncer?
4. De que maneiras a defectividade na função da p53 e os defeitos resultantes na apoptose e reparo de DNA facilitam a marcha em direção à progressão tumoral?
5. Que tipos de promoção de tumor, conforme descritos no Capítulo 11, favorecem a evolução genética de clones celulares pré-malignos?
6. Que evidência implica compostos mutagênicos originados fora do corpo na patogênese de cânceres humanos? Como alguém pode quantificar sua contribuição para a carcinogênese humana, comparada com a dos mutágenos e processos mutagênicos de origem endógena?
7. Como os defeitos em vários pontos de verificação do ciclo celular permitem taxas aceleradas de acúmulo de mutações?
8. Como as propriedades biológicas das células-tronco reduzem a taxa na qual os tecidos acumulam genes mutantes?
9. Como a existência de células-tronco cancerosas afeta o cálculo da taxa na qual mutações podem ser acumuladas para permitir o avanço da progressão tumoral múltiplas etapas?
10. Como a heterogeneidade genética do conjunto de genes humanos afeta o funcionamento de vários tipos de defesas biológicas que foram erguidas para prevenir o acúmulo de alelos mutantes em células somáticas humanas?

Leitura adicional

- Ames BN (1989) Endogenous DNA damage as related to cancer and aging. *Mutat. Res.* 214, 41–46.
- Bartek J, Lukas C & Lukas J (2004) Checking on DNA damage in S phase. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 792–804.
- Bartek J & Lukas J (2003) Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer. *Cancer Cell* 3, 421–429.
- Burgers PMJ (1998) Eukaryotic DNA polymerases in DNA replication and DNA repair. *Chromosoma* 107, 218–227.
- Cahill DP, Kinzler KW, Vogelstein B & Lengauer C (1999) Genetic instability and darwinian selection in tumours. *Trends Cell Biol.* 9, M57–M60.
- D'Assoro AB, Lingle WL & Salisbury JL (2002) Centrosome amplification and the development of cancer. *Oncogene* 21, 6146–6153.
- de Boer J & Hoeijmakers JHJ (2000) Nucleotide excision repair and human syndromes. *Carcinogenesis* 21, 453–460.
- Downs JA & Jackson SP (2003) Cancer: protective packaging for DNA. *Nature* 424, 732–734.
- Duensing S & Münger K (2002) Human papillomavirus and centrosome duplication errors: modeling the origins of chromosomal stability. *Oncogene* 21, 6241–6248.
- Fearon ER (1997) Human cancer syndromes: clues to the origin and nature of cancer. *Science* 278, 1043–1050.
- Friedberg EC (2001) How nucleotide excision repair protects against cancer. *Nat. Rev. Cancer* 1, 22–33.
- Friedberg EC, McDaniel LD & Schultz RA (2004) The role of endogenous and exogenous DNA damage and mutagenesis. *Curr Opin. Genet. Dev* 14, 5–10.
- Friedberg EC, Walker GC & Siede W (1995) DNA Repair and Mutagenesis. Washington, DC: ASM Press.
- Gold LS, Ames BN & Slone TH (2002) Misconceptions about the causes of cancer. In *Human and Environmental Risk Assessment: Theory and Practice* (D Paustenbach ed), pp 1415–1460. New York: John Wiley & Sons.
- Grady WM (2004) Genomic instability and colon cancer. *Cancer Metast. Rev* 23, 11–27.
- Hartwell L (1992) Defects in a cell cycle checkpoint may be responsible for the genomic instability of cancer cells. *Cell* 71, 543–546.
- Heinen C, Schmutte C & Fishel R (2002) DNA repair and tumorigenesis. *Cancer Biol. Ther.* 1, 477–485.

- Hoeijmakers JH (2001) Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 411, 366–374.
- Jackson SP (2002) Sensing and repairing DNA double-strand breaks. *Carcinogenesis* 23, 687–696.
- Jallepalli PV & Lengauer C (2001) Chromosome segregation and cancer: cutting through the mystery. *Nat. Rev. Cancer* 1, 109–117.
- Jiricny J & Nyström-Lahti M (2000) Mismatch repair defects in cancer. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 10, 157–161.
- Kastan MB & Bartek J (2004) Cell cycle checkpoints and cancer. *Nature* 432, 316–323.
- Kinzler K & Vogelstein B (eds) (1998) *The Genetic Basis of Human Cancer*. New York: McGraw-Hill.
- Lengauer C, Kinzler KW & Vogelstein B (1998) Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 396, 643–649.
- Lindahl T & Wood RD (1999) Quality control by DNA repair. *Science* 286, 1897–1905.
- Loeb KR & Loeb LA (2000) Significance of multiple mutations in cancer. *Carcinogenesis* 21, 379–385.
- Loeb LA (2001) A mutator phenotype in cancer. *Cancer Res.* 61, 3230–3239.
- Loeb LA, Loeb KR & Anderson JP (2003) Multiple mutations and cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 776–781.
- Lynch HT & de la Chapelle A (2003) Hereditary colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* 348, 919–932.
- Marnett LJ (2000) Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis* 21, 261–270.
- Marnett LJ & Plataras JP (2001) Endogenous DNA damage and mutation. *Trends Genet.* 17, 214–221.
- Masuda A & Takahashi T (2002) Chromosome instability in human lung cancers: possible underlying mechanisms and potential consequences in the pathogenesis. *Oncogene* 21, 6884–6897.
- Modrich P & Lahue R (1996) Mismatch repair in replication fidelity, genetic recombination, and cancer biology. *Annu. Rev. Biochem.* 65, 101–133.
- Nakabeppu Y, Tsuchimoto D, Ichinoe A et al. (2004) Biological significance of the defense mechanisms against oxidative damage in nucleic acids caused by reactive oxygen species: from mitochondria to nuclei. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1011, 101–111.
- Nowell PC (1976) The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 194, 23–28.
- Perucho M (2003) Tumors with microsatellite instability: many mutations, targets and paradoxes. *Oncogene* 22, 2223–2225.
- Pierce GB, Shikes R & Fink LM (1978) *Cancer: A Problem of Developmental Biology*, Englewood Cliff, NJ: Prentice-Hall.
- Pihan GA (1998) Centrosome defects and genetic instability in malignant tumors. *Cancer Res.* 58, 3974–3985.
- Rahman N & Stratton MR (1998) The genetics of breast cancer susceptibility. *Ann. Rev. Genet.* 32, 95–121.
- Rajagopalan H & Lengauer C (2004) Aneuploidy and cancer. *Nature* 432, 338–341.
- Scully R & Livingston DM (2000) In search of the tumour-suppressor functions of BRCA1 and BRCA2. *Nature* 408, 429–432.
- Sedgwick B (2004) Repairing DNA-methylation damage. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 148–157.
- Sieber O, Heinemann K & Tomlinson I (2005) Genomic stability and tumorigenesis. *Semin. Cancer Biol.* 15, 61–66.
- Shiloh Y (1997) Ataxia-telangiectasia and the Nijmegen breakage syndrome: related disorders but genes apart. *Ann. Rev. Genet.* 31, 635–662.
- Shiloh Y (2004) ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat. Rev. Cancer* 3, 155–168.
- Smith ML & Seo YR (2002) p53 regulation of DNA excision repair pathways. *Mutagenesis* 17, 149–156.
- Starita LM & Parvin JD (2003) The multiple nuclear functions of BRCA1: transcription, ubiquitination and DNA repair. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15, 345–350.
- Sugimura T (2000) Nutrition and dietary carcinogens. *Carcinogenesis* 21, 387–395.
- Tainer JA & Friedberg EC (2000) Dancing with the elephants: the structural biology of DNA pathways. *Mutat. Res.* 460, 139–141.
- Venkitaraman AR (2002) Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2. *Cell* 108, 171–182.
- Wilson JH & Elledge SJ (2002) *BRCA2* enters the fray. *Science* 297, 1822–1823.
- Wogan GN, Hecht SS, Felton JS et al. (2004) Environmental and chemical carcinogenesis. *Semin. Cancer Biol.* 14, 473–486.
- Wood RD, Mitchell M, Sgouros J & Lindahl T (2001) Human DNA repair genes. *Science* 291, 1284–1289.
- Zhou BB & Elledge SJ (2000) The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* 408, 433–438.



CAPÍTULO 13

O Diálogo Substitui o Monólogo: Interações Heterotípicas e a Biologia da Angiogênese

“Idéias simples são erradas. Idéias complicadas são inacessíveis.”

Paul Valéry, poeta, 1942

Um simples e potente paradigma conceitual difunde-se na maioria das discussões anteriores deste livro: câncer é uma doença das células, e os fenótipos de células cancerígenas podem ser compreendidos pelo exame de genes e proteínas dentro delas. A origem dessa idéia está clara, sendo rastreável diretamente de volta para genética de bactérias e leveduras. Essas duas especialidades de pesquisa tiveram sucesso em função de que foram bem servidas pelo postulado de que o genótipo celular determina todos os aspectos de um fenótipo celular. De fato, foi comprovado que virtualmente todos os atributos de células individuais bacterianas e de levedura derivam diretamente dos genes que esses microrganismos carregam em seus genomas.

A aplicação desse conceito a metazoários e seus tecidos teve vantagens óbvias para os biólogos. Organismos metazoários são complexos quase que além das medidas, e sua complexidade tem frequentemente prevenido pesquisadores de extrair simples e incontestáveis verdades sobre a função do organismo. Em resposta, muitos pesquisadores, notavelmente biólogos moleculares, biólogos celulares e bioquímicos, adotaram a crença da ciência **reducionista**: quando trabalhando com sistemas complexos, a melhor maneira de se chegar a conclusões sólidas e rigorosas é dividir esses sistemas em componentes

mais simples e mais plausíveis e estudar cada um separadamente. Enquanto as lições aprendidas podem relatar somente uma pequena parte de um grande sistema, pelo menos elas são sólidas e definitivas e não requerem uma revisão substancial a cada vez que uma nova geração de pesquisadores revisitam esses sistemas complexos e as partes que os compõem.

Tal reducionismo permitiu que diversas áreas da pesquisa do câncer obtivessem sucesso. Prova disso é o progresso descrito nos capítulos anteriores deste livro: quando o primeiro proto-oncogene foi descoberto no terceiro quarto do século XX (Seção 3.9), quase nada era sabido sobre genética e biologia molecular do câncer. Ao final do século, informações sobre como os cânceres iniciam e progridem até estados altamente agressivos e malignos estavam disponíveis em abundância. Muito desta avalanche de informações surgiu de levar o paradigma de reducionismo ao seu limite – desmontando tecidos normais e neoplásicos em componentes celulares e células em moléculas componentes.

Como mencionado anteriormente, o pacto do reducionista adotado por diversos estudiosos da comunidade da pesquisa do câncer tratou o câncer como um processo autônomo celular: todos os atributos das células cancerosas podem ser compreendidos em termos de genes que essas células carregam. Na verdade, ainda havia uma outra noção encrustada em seus pensamentos: todos os traços de um tumor podem ser rastreados diretamente de volta ao comportamento individual de células cancerosas dentro de uma massa tumoral.

No final do século XX, tornou-se muito claro que muitas das características dos tumores não poderiam de fato ser rastreadas diretamente de volta para as células cancerosas individuais e para os genes que elas carregam. As grandes simplificações combinadas por pesquisadores de câncer uma geração anterior começaram a perder sua utilidade. Cada vez mais as evidências mostraram que, na verdade, o câncer é uma doença dos tecidos, em particular os tecidos complexos que chamamos de tumores.

A maneira de pensar dos reducionistas negou certas realidades que oncologistas clínicos e patologistas confrontavam rotineiramente, ou seja, que carcinomas – que constituem mais de 80% das explosões de cânceres em humanos – derivam de tecidos epiteliais de estrutura microscópica muito complexa. As caracterizações histopatológicas desses tumores epiteliais revelaram que eles são compostos de vários tipos celulares distintos. De fato, mesmo análises precipitadas sob o microscópio indicam que a maioria dos carcinomas é tão complexa histologicamente quanto os tecidos epiteliais normais dos quais se desenvolveram; exemplos dessa complexidade podem ser vistos na Figura 13.1. Em alguns casos de ocorrência comum de carcinomas, como os de mama, cólon, estômago e pâncreas, as células não-neoplásicas que constituem o estroma do tumor podem possuir até 90% dessas células em uma massa tumoral. Uma versão extrema disso é apresentada por células de outro tipo de tumor sólido – doença de Hodgkin, um linfoma no qual as células não-neoplásicas representam 99% das células da massa tumoral (Figura 13.2).

Nosso primeiro instinto é rejeitar essas células não-neoplásicas como contaminantes que desviam a atenção, que confundem em vez de esclarecer a tentativa de entender a biologia dos tumores. Fazer isso agora parece bastante não-inteligente. Resultados de pesquisas recentes tornam claro que células não-neoplásicas, notavelmente células estromais de carcinomas, são ativas, de fato colaboradores essenciais das células epiteliais neoplásicas de uma massa tumoral, tendo sido recrutadas e então exploradas pelas células cancerosas. A biologia dessas células recrutadas agora aparenta ser quase tão importante quanto à das células neoplásicas na permissão do crescimento de tumores.

Isso quer dizer que a doença do câncer é mais do que células cancerosas conversando entre elas em monólogos sem fim. Sabemos, do contrário, que na maioria dos tumores as células neoplásicas estão em constante comunicação com seus vizinhos não-neoplásicos. Neste capítulo, focamos nossas discussões especificamente em carcinomas, nos quais as interações de células neoplásicas e não-neoplásicas nos tumores são muito melhor compreendidas do que muitos outros tipos de câncer que afetam os humanos.

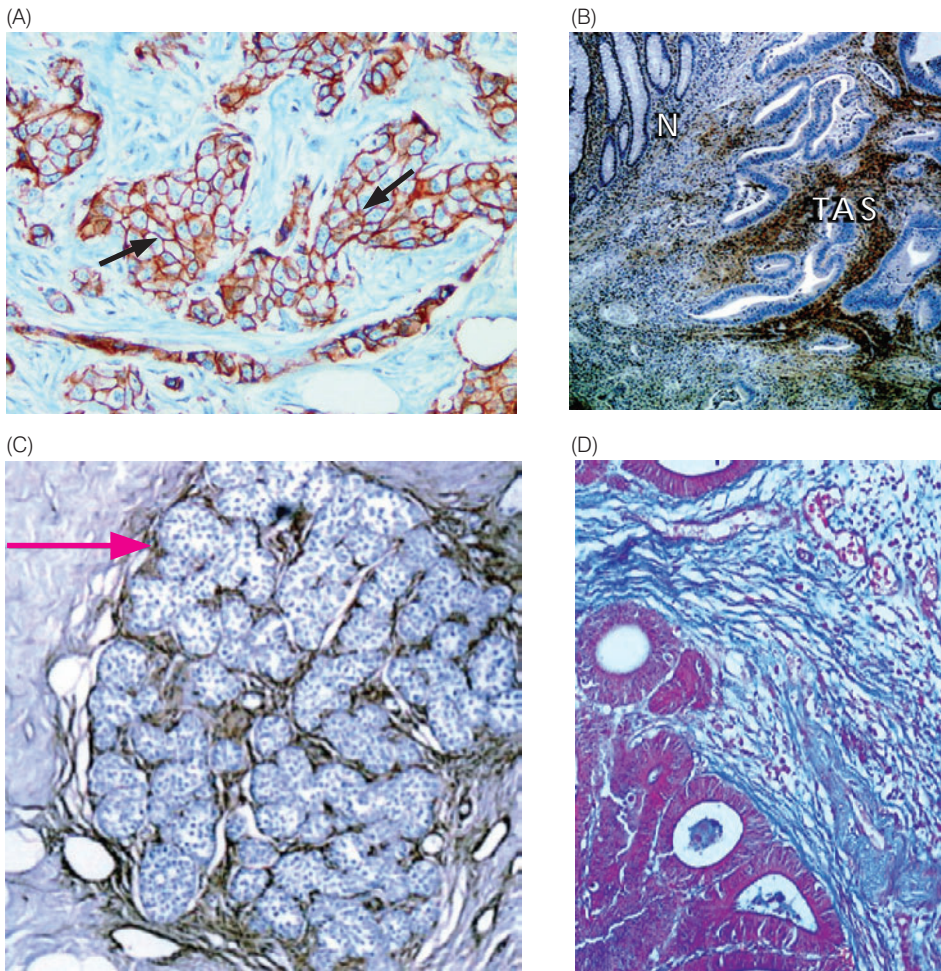


Figura 13.1 Componentes do estroma em inúmeros carcinomas que ocorrem com frequência. Uma variedade de carcinomas comuns contém significativas proporções tanto de células cancerosas epiteliais como de células recrutadas do estroma. Isso é aparente nos carcinomas mostrados aqui. (A) Carcinoma de ducto de mama invasivo de alto grau, no qual as membranas (setas) das células epiteliais são coradas de marrom, enquanto o núcleo das células estromais são azul-claro. (B) Carcinoma de cólon (lado direito) e mucosa normal do cólon (N, lado esquerdo) no qual o estroma associado ao tumor (TAS, direito) está imunocorado de marrom-escuro por PINCH (uma proteína associada à porção caudal citoplasmática das integrinas), enquanto o núcleo das células cancerosas epiteliais revestindo internamente os ductos são azul-claro. (C) Carcinoma lobular *in situ* da mama mostrando pequenos agrupamentos de células cancerosas (azul-claro, seta) circundados por finas camadas dos fibroblastos do estroma que foi imunocorado pelo antígeno PINCH (marrom-escuro). (D) Adenocarcinoma do estômago no qual as células cancerosas (roxo, inferior à esquerda) são adjacentes ao extensivo estroma, o qual foi corado para colágeno (azul). (A, de A. Gupta, C.G. Deshpande e S. Badve, *Cancer* 97: 2341-2347, 2003; B e C, de J. Wang-Rodriguez, A.D Dreilinger, G.M Alsharabi e A. Rearden, *Cancer* 95:1387-1395, 2002; D, de S. Ohno, M. Tachibana, T. Fujii et al., *Int. J. Cancer* 97: 770-774, 2002.)

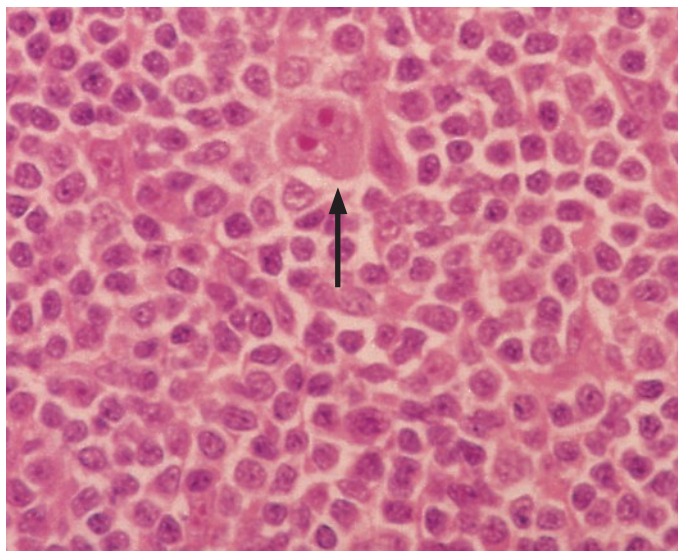


Figura 13.2 Células neoplásicas raras no linfoma de Hodgkin. Células normais, não-neoplásicas, podem constituir a maioria das células vivas em uma massa tumoral. Uma forma extrema disso é ilustrada aqui pela doença de Hodgkin, um linfoma no qual 99% das células são linfócitos normais recrutados que circundam uma rara célula neoplásica Reed-Sternberg (seta). (De A.T. Skarin, *Atlas of Diagnostic Oncology*, 3rd ed. Philadelphia: Elsevier Science Ltd., 2003.)

13.1 Tecidos epiteliais normais e neoplásicos são formados a partir de tipos celulares interdependentes

A verdadeira complexidade do estroma de cânceres epiteliais torna-se aparente somente a uma alta magnitude sob o microscópio. Além de células neoplásicas do epitélio (i. e., carcinoma), alguns tipos de células estromais habitam o carcinoma. Essas células estromais incluem fibroblastos, miofibroblastos, células endoteliais, pericitos, células da musculatura lisa, adipócitos, macrófagos, linfócitos e mastócitos (Figura 13.3: veja também a Seção 13.3). Em função de que alguns desses tipos celulares constituem somente uma pequena proporção do estroma de certos tumores, sua presença torna-se aparente apenas por meio do uso de imunocoloração com anticorpos que se ligam a antígenos específicos de tipos celulares.

Os diversos tipos de células estromais de um tumor são todos membros de diversas linhagens celulares mesenquimais que geram tanto os tecidos conjuntivos como vários tipos de células imunes nos tecidos sanguíneo e imune e, portanto, são biologicamente muito diferentes das células epiteliais cuja transformação direciona para o crescimento de carcinomas. (No caso de tumores não-epiteliais como sarcomas, em que as próprias células cancerosas são de origem mesenquimal, as barreiras entre os compartimentos celulares malignos e as células não-malignas de uma massa tumoral são menos facilmente definidos.)

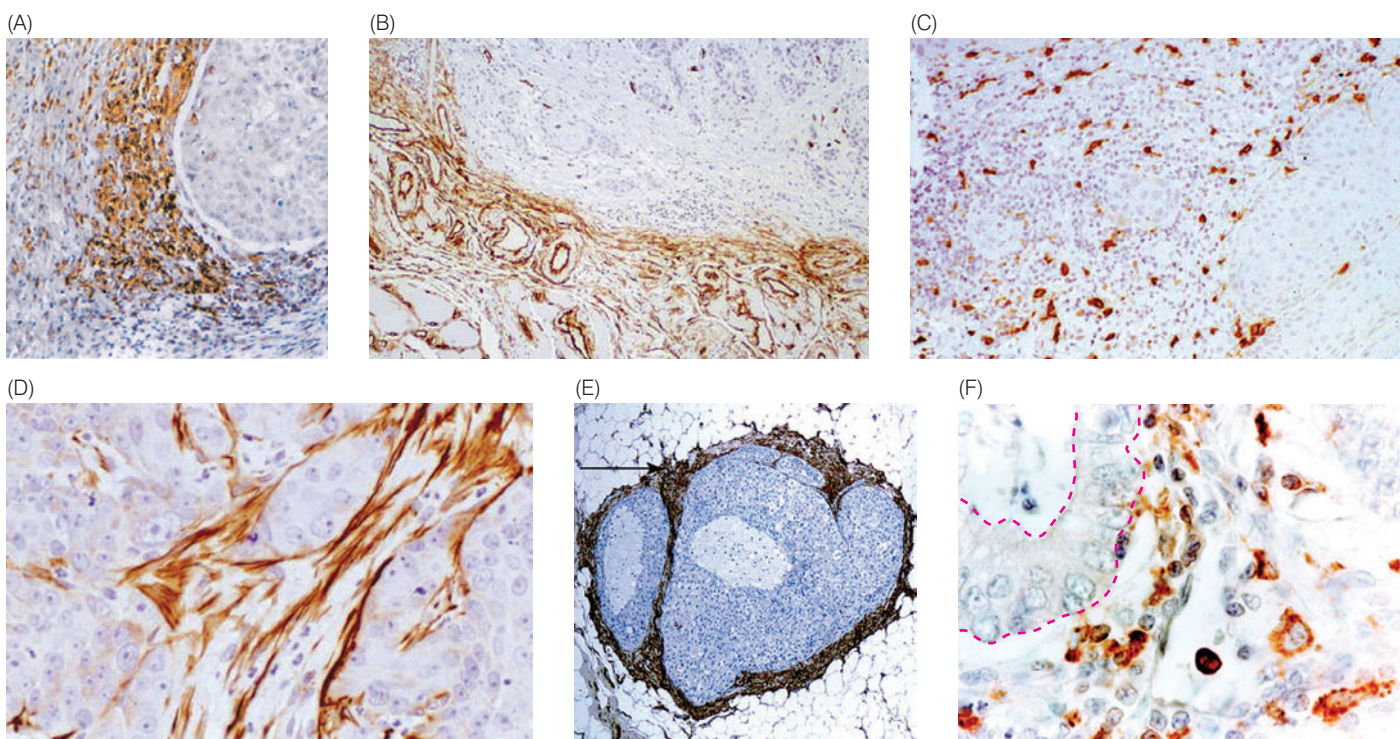


Figura 13.3 Uma variedade de tipos celulares distintos no estroma de carcinomas. Vários anticorpos podem ser usados para imunocorar tipos celulares mesenquimais específicos no estroma de carcinomas. (A) Linfócitos T CD4 antígeno-positivo (*marrom*) são aparentes no estroma de um carcinoma pulmonar de células não-pequenas (NSCLC). O estroma de células escamosas da cavidade oral, faringe e laringe, podem conter (B) fibrócitos CD34 antígeno-positivos (*marrom*), (C) células de mastócitos CD117 antígeno-positivas (*marrom*) e (D) miofibroblastos do músculo liso α actina-positivos (*marrom*). (E) O estroma de um carcinoma do ducto de mama *in situ* (DCIS) mostra fibroblastos PINCH antígeno-positivos (*marrom-escuro*; veja a Figura 13.1B) arranjados em um anel

imediatamente ao redor do carcinoma (*seta*), o qual é circundado, por sua vez, por adipócitos (*extremidades em azul-claro*). (F) Monócitos, os precursores dos macrófagos, podem ser detectados por meio da apresentação do antígeno CD11b+ neste adenocarcinoma do colorretal humano. As células cancerosas epiteliais (*azul-claro*) formam um ducto, delineado acima, no lado *esquerdo superior*. (A, de O. Wakabayashi, K. Yamazaki, S. Oizumi et al., *Cancer Sci.* 94:1003-1009, 2003; B, C, and D, de P.J. Barth, T. Schenck zu Schweinsberg, A. Ramaswamy and R. Moll, *Virchows Arch.* 444:231-234, 2004; E, de J. Wang-Rodriguez, A.D. Dreiling, G. M. Alsharabi and A. Rearden, *Cancer* 95: 1387-1395, 2002; F, de E. Barbera-Guillem, J.K. Nyhus, C.C. Wolford et al., *Cancer Res.* 62:7042-7049, 2002.)

Na ausência de outra informação, podemos explicar a presença desses vários tipos de células estromais de um carcinoma de duas maneiras. Elas podem representar remanescentes de células que residem no estroma de um tecido antes de iniciar o desenvolvimento tumoral. Durante subsequente expansão de uma população celular tumoral, grupos de células cancerígenas podem ter se inserido entre essas camadas de células estromais normais preexistentes, gerando então tecidos de textura rica que são vistos quando a maioria dos carcinomas que são examinados microscopicamente.

A explicação alternativa para a presença dessas inúmeras células estromais é mais intrigante e é provavelmente a mais correta para a grande maioria dos tumores. O raciocínio por trás desse segundo modelo depende do nosso entendimento atual de como tecidos normais com arquitetura complexa mantêm sua estrutura e função. Em tais tecidos, as proporções adequadas de vários componentes celulares devem depender da troca contínua de sinais entre eles. Essas interações envolvem múltiplos tipos celulares diferentes, cada um seguindo seu próprio programa de diferenciação distinto. Tal comunicação entre tipos celulares diferentes é chamada de sinalização **heterotípica** e é utilizada por cada tipo celular para encorajar ou limitar a proliferação de outros tipos de células ao redor.

Estendendo tal pensamento, podemos especular que muitas dessas interações heterotípicas operando em tecidos normais continuam executando importantes funções na biologia dos tumores que se desenvolvem nesses tecidos. Isso poderia sugerir que, como células epiteliais normais, células de carcinoma continuam a controlar a população de células estromais próximas a elas, talvez por recrutar as células estromais dos tecidos adjacentes normais, encorajando, assim, a sua proliferação. Operando em outra direção, as células estromais também podem influenciar na proliferação de células epiteliais e na sobrevivência na massa tumoral.

Em tecidos normais, esses canais de sinalização heterotípica dependem, em grande parte, da troca de (1) fatores de crescimento mitogênicos, como fator de crescimento de hepatócito (HGF), fator de crescimento de transformação α (TGF- α) e fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF); (2) sinais inibitórios de crescimento, como o fator de crescimento de

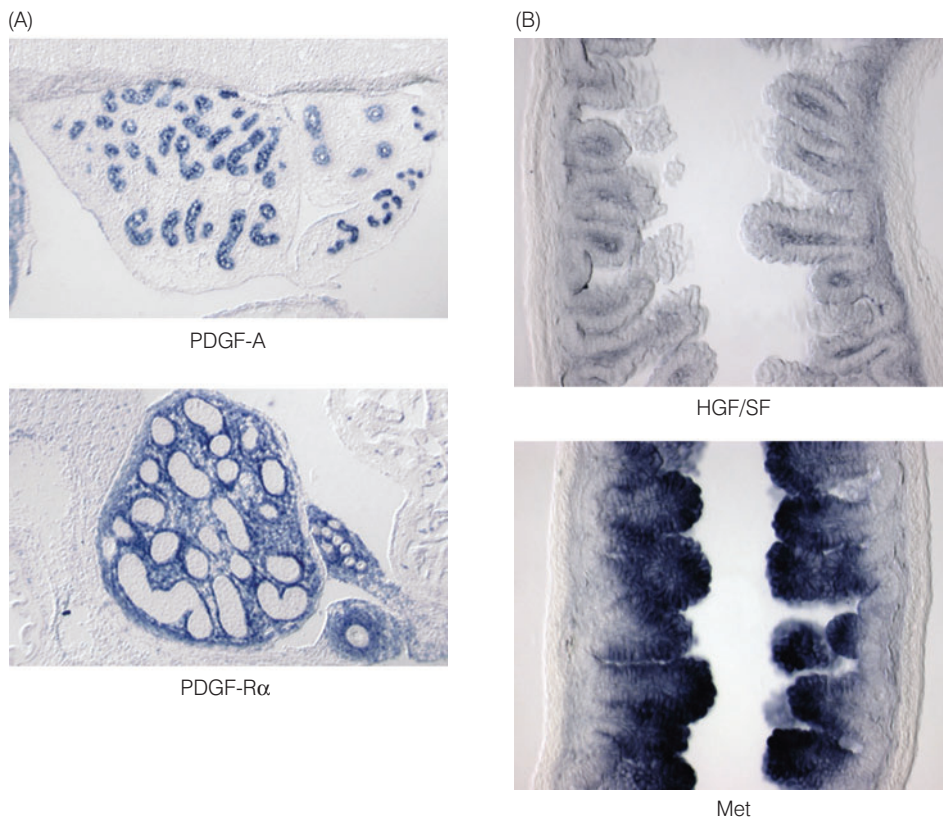


Figura 13.4 Sinalização receptor-ligante heterotípica (A) Em tecidos epiteliais, a síntese de PDGF-A e de seu receptor (PDGF-R α) está geralmente confinada a tipos celulares distintos. Nos testículos, assim como em muitos tecidos epiteliais autênticos, a expressão de PDGF está confinada às células do epitélio tubular (*acima*), enquanto a expressão do seu receptor está confinada às células mesenquimais das proximidades (*abaixo*). (B) A expressão recíproca do receptor Met e de seu ligante, chamado variadamente de fator de crescimento de hepatócito (HGF) ou fator de dispersão (SF), é mostrada aqui no íleo de camundongos embrionários (porção inferior do intestino delgado). Em cada vilosidade em forma de dedo, vista em seção longitudinal, o mRNA de HGF/SF, detectado por hibridização *in situ*, é feito pelas células mesenquimais no centro da vilosidade (*acima*), enquanto Met é expressa por células epiteliais que revestem a superfície das vilosidades (*abaixo*). (A, de L. Gnessi, S. Basciani, S. Mariani et al., *J. Cell Biol.* 149:1019-1026, 2000; B, cortesia de S. Birchmeier e C. Birchmeier.)

transformação β (TGF- β); e (3) fatores tróficos, como os fatores 1 e 2 de crescimento semelhantes a insulina (IGF-1 e 2), os quais favorecem a sobrevivência celular (Figura 13.4).

Durante a formação inicial de tumores, interações heterotípicas possuem um papel importante em dirigir muitos tipos de promoção tumoral. Além disso, células estromais, como os macrófagos, neutrófilos e linfócitos, participam da resposta inflamatória que envolve a liberação de TNF- α e prostaglandinas; essas moléculas então estimulam a proliferação de células epiteliais nas redondezas (Seção 11.16).

Muitas interações heterotípicas continuam a operar depois que os tumores são formados. Para citar alguns exemplos, células epiteliais de um carcinoma frequentemente liberam PDGF, para as quais células estromais – especialmente fibroblastos, miofibroblastos e macrófagos – possuem receptores; as células estromais alternam liberando IGF-1, o qual beneficia o crescimento e sobrevivência das células cancerosas ao redor. Similarmente, células neoplásicas de melanoma liberam PDGF, que obtém a produção de IGF-2 a partir de fibroblastos estromais ao redor; esse IGF-2 ajuda a manter a viabilidade das células do melanoma. Células estromais em cânceres de mama liberam o fator CXCL12 (uma *quimiocina*; veja a Seção 13.5) e o fator de crescimento HGF/SF, o qual estimula a proliferação e sobrevivência das células epiteliais cancerígenas ao redor. Por regular número e posição umas das outras, células epiteliais e estromais podem assegurar a representação e a localização ótimas de cada tipo celular dentro de um tecido normal e um neoplásico.

As células epiteliais e estromais em tecidos epiteliais normais colaboram na construção da matriz extracelular especializada (ECM) que se encontra entre elas, chamada de membrana basal ou lâmina basal (Figura 13.5; veja também a Figura 2.3). Por exemplo, células epiteliais da pele, os queratinócitos, expressam genes que especificam muitos dos principais componentes protéicos da membrana basal, incluindo o colágeno tipo IV e lamininas; as células estromais também contribuem para essa construção, de uma maneira que deve ainda ser documentada em detalhes. Certos **proteoglicanos** na membrana basal, como o perlecano, fornecem à matriz uma hidratação aumentada e sítios aos quais fatores de crescimento podem ser anexados para armazenamento por um longo período. Contínuas ligações à membrana basal, mediadas amplamente por integrinas e pelos hemidesmossomos que elas constroem (veja a Figura 13.5A), são essenciais para a sobrevivência de muitos tipos de células epiteliais, e a perda dessas ligações frequentemente provoca *anoikis*, a forma de apoptose resultante da perda de ancoramento a um substrato sólido (veja, por exemplo, a Figura 9.21).

As células **endoteliais** que se reúnem para formar o revestimento interno das paredes dos capilares e vasos sanguíneos maiores (Figura 13.6A), assim como dos ductos **linfáticos**, representam um componente vital no estroma normal e neoplásico. Como discutido em maior detalhe a seguir, sua proliferação é encorajada por outras células tanto no epitélio como no estroma de maneira a garantir o acesso de todas essas células a um suprimento sanguíneo adequado. Uma vez que os capilares se organizam e se tornam funcionais, eles fornecem nutrientes essenciais e oxigênio para as células ao redor. Fomos introduzidos a tais interações anteriormente, quando lemos que células as quais não possuem acesso adequado ao oxigênio liberam **fatores angiogênicos** que estimulam o crescimento interno de capilares (Seção 7.12).

Enquanto a formação capilar está procedendo, células endoteliais secretam fatores de crescimento que estimulam a proliferação de tipos celulares não-endoteliais ao redor. Mais importante, células endoteliais liberam PDGF e HB-EGF (EGF que se liga à heparina), que permitem que elas atraíam células periendothelias chamadas de **pericitos** e células vasculares da musculatura lisa que, juntas, criam a camada externa dos capilares, sendo chamadas, às vezes, de células **murais**, para distingui-las das células endoteliais lúminais (Barra lateral 13.1). Uma vez no local, os pericitos (os quais organizam células da musculatura lisa) se alternam para liberar fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e angiopoietina-1 (Ang-1), os quais fornecem sinais de sobrevivência importantes para as células endoteliais que os recrutaram primeiramente. Além disso, essas células murais fornecem aos tubos endoteliais estabilidade estrutural e uma habilidade de resistir a forças exercidas pela pressão sanguínea (Figura 13.6).

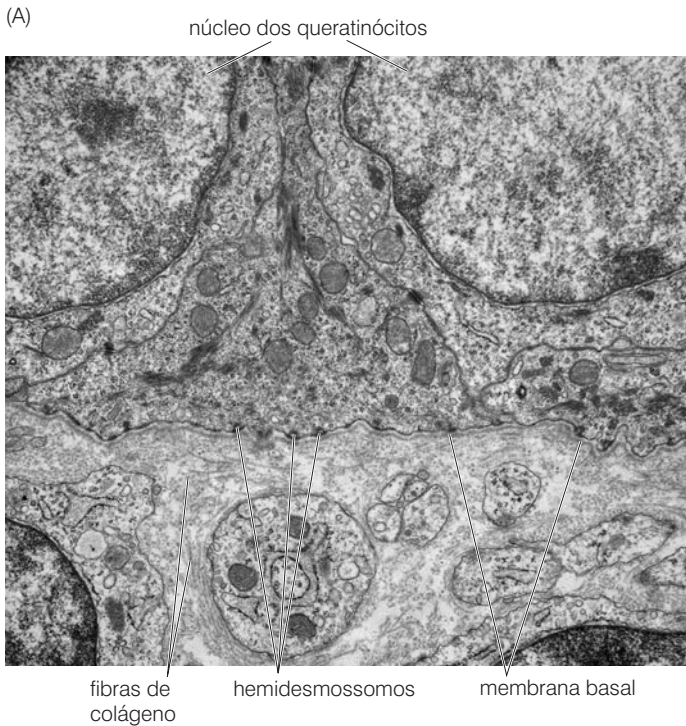
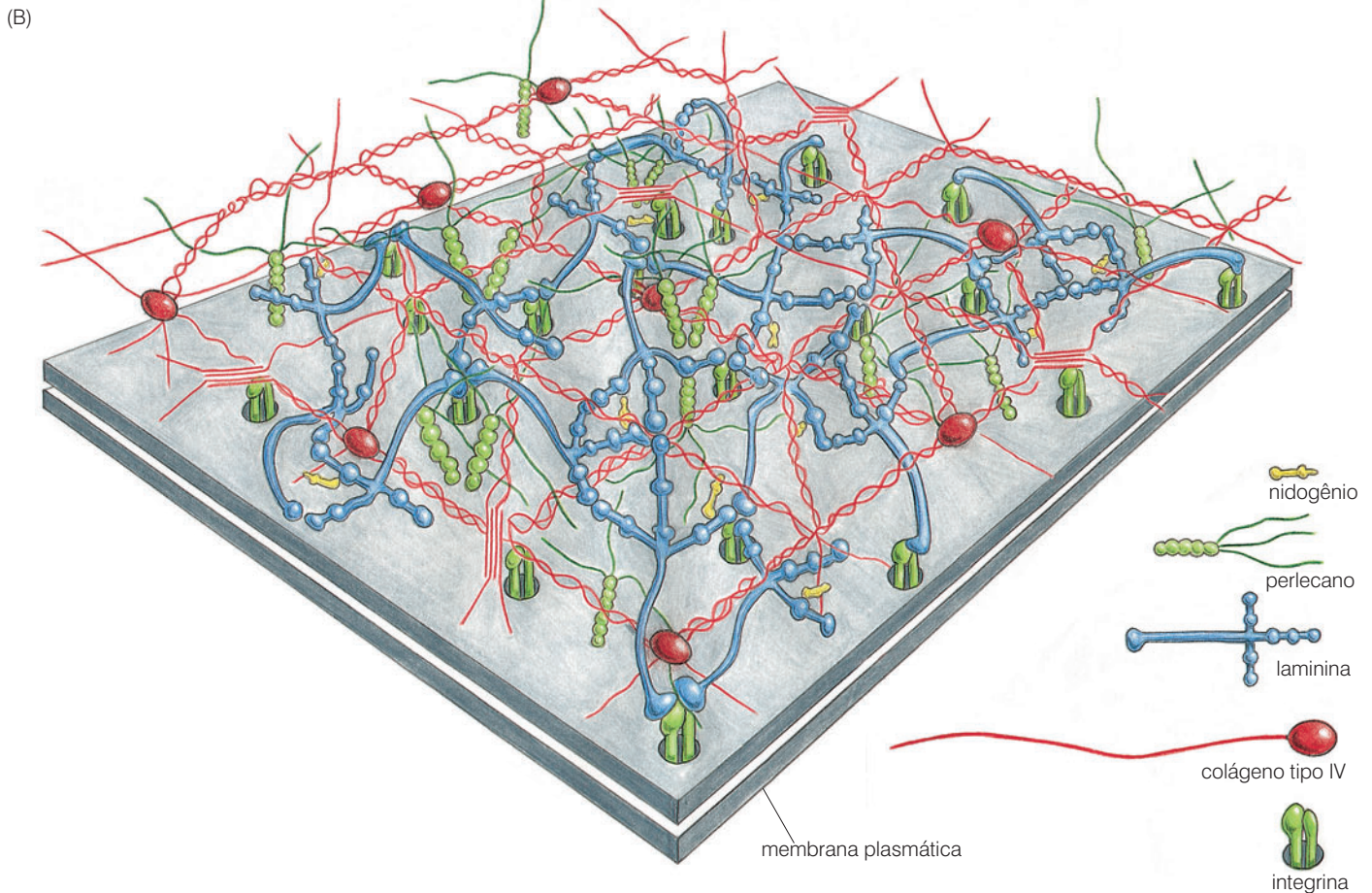


Figura 13.5 A membrana basal (A) Em tecidos epiteliais, a matriz extracelular especializada (ECM) chamada de membrana basal (BM) separa as células epiteliais (*acima*) do estroma (*abaixo*). Como mostrado nesta micrografia eletrônica de transmissão da pele de um camundongo recém-nascido, as células epiteliais da pele (chamadas queratinócitos) estão presas em um lado (*acima*) da BM, sendo ancoradas em parte por meio de estruturas chamadas de *hemidesmosomos*, os quais são compostos por pequenos grupos de integrinas que se ligam a proteínas da BM, as lamininas; os núcleos dos queratinócitos estão marcados aqui. Abaixo da membrana basal estão as fibras de colágeno e porções de células mesenquimais constituindo o estroma da pele, isto é, a derme. (B) Este desenho esquemático indica que a membrana basal é composta amplamente por quatro proteínas ECM majoritárias, chamadas de laminina, colágeno tipo IV, perlecano e nidogênio. Esse emaranhado molecular altamente permeável permite que uma variedade de moléculas atravesse a membrana em ambas as direções. Uma membrana basal especializada, não mostrada aqui, está subjacente às células endoteliais em capilares. (A, cortesia de H. A. Pasolli e E. Fuchs; B, de B. Alberts et al., *Molecular Biology of the Cell*, 4th ed. New York: Garland Science, 2002, baseado em H. Colognato e P. D. Yurchenko, *Dev. Dynamics* 218:213-234, 2000.)



As localizações de grandes populações de células estromais dentro dos carcinomas fornecem indicação clara de que, à medida que os componentes epiteliais desses tumores se expandem, esse crescimento é acompanhado pela proliferação coordenada de células estromais. Na ver-

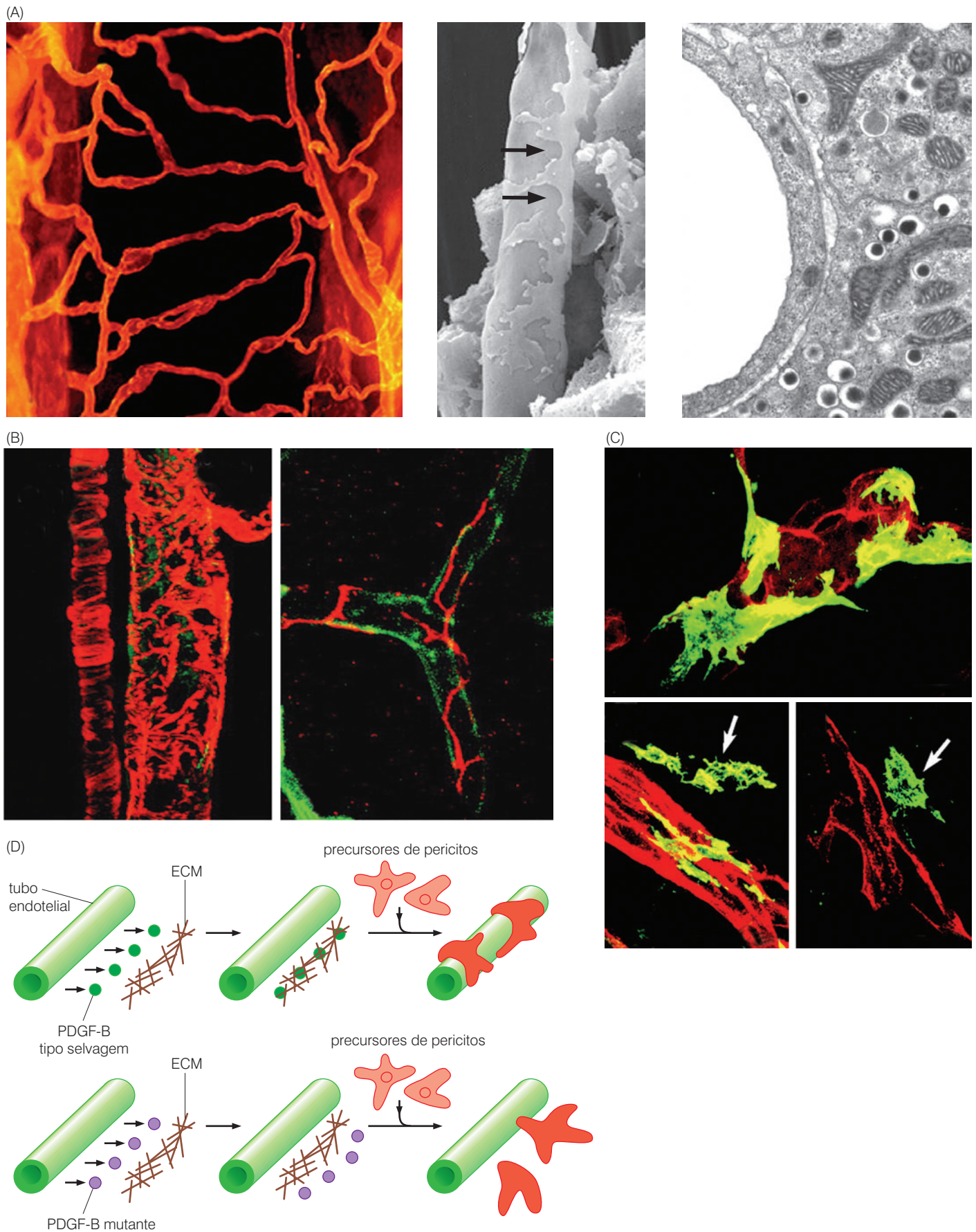


Figura 13.6 Pericitos, células musculares lisas e células endoteliais dos microvasos (A) Microvasos podem ser estudados usando-se pelo menos três tipos de microscopia. Microscopia de imunofluorescência (*esquerda*) dos capilares em uma traquéia normal de camundongo (usando um anticorpo que reconhece o antígeno CD31 específico de célula endotelial) revela uma rede bem-organizada de vasos. No nível de microscopia eletrônica de varredura (*centro*), observa-se um capilar que organiza um tubo cilíndrico da parede lisa com pericitos anexados em diversos pontos de sua superfície (*setas*). Na micrografia de transmissão (*direita*), a secção de um capilar revela que sua parede é construída pelo citoplasma dobrado de uma célula endotelial. (B) Essa micrografia de imunofluorescência resolve os pericitos e células endoteliais. Normalmente, os pericitos e células musculares lisas (*ambos avermelhados*) cobrem o lado externo dos tubos de células endoteliais (*verde*), formando vênulas e arteríolas com estruturas normais (*painel esquerdo*). Nesses vasos, a cobertura de células endoteliais por pericitos e células musculares lisas é freqüentemente tão completa que se torna difícil visualizar as células endoteliais que se encontram logo abaixo dos pericitos. Ao contrário, em capilares (*painel da direita*), os pericitos estão dispostos mais espaçadamente, mas não estão, apesar disso, fortemente anexados às células endoteliais que formam os capilares. (C) Em geral, os pericitos (*verde-amarelo*) estão fortemente anexados aos capilares (*vermelho, painel superior*). No entanto, camundongos têm sido alterados geneticamente a fim de se obter moléculas PDGF-B mutantes que não conseguem se anexar à matriz extracelular e, portanto, difundem-se das células endoteliais formando esse fator de crescimento. Como consequência, os pericitos não são mais atraídos para as células endoteliais e perdem o contato íntimo com os tubos capilares (*setas, painéis inferiores*). (D) Esta sobreposição de pericitos com os capilares depende da localização do PDGF-B, o qual é secretado por células endoteliais (*verde-claro*). Normalmente (*acima*), esse PDGF-B (*verde-escuro*) é capturado imediatamente adjacente às células endoteliais na matriz extracelular (ECM, *marrom*), onde serve para atrair precursores de pericitos (*rosa*) que se anexam por si próprios (*vermelho*) fortemente aos tubos capilares formados por células endoteliais. Entretanto (*abaixo*), se PDGF-B é desprovido de seqüências de aminoácidos que normalmente se ligam a ECM (*púrpura*), ele se difunde a partir dos tubos capilares, e pericitos recrutados são espalhados a alguma distância desses capilares. (A, de T. Inai, M. Mancuso, H. Hashizume et al., *Am. J. Pathol.* 165:35-52, 2004; B, de S. Morikawa, P. Baluk, T. Kaidoh et al., *Am. J. Pathol.* 160:985-1000, 2002; C, de A. Abramsson, P. Lindblom e C. Betsholtz, *J. Clin. Invest.* 112:1142-1151, 2003.)

dade, células estromais são às vezes encontradas em camadas entre células de carcinoma na maioria das **metástases** – os tumores secundários que se tornam estabelecidos em sítios anatómicos longe do inicialmente formado, tumores primários. Como consequência, mesmo aquelas células cancerígenas que são suficientemente independentes para deixar o tumor primário e encontrar novos tumores em locais distantes em geral encontram a necessidade de recrutar células estromais e encorajar sua proliferação (Figura 13.7A), aparentemente para dar assistência na construção dessas novas colônias tumorais. Na ocasião, células metastáticas irão insinuar-se para o estroma existente do tecido no qual elas se instalaram (Figura 13.7B), mais uma vez demonstrando sua necessidade de um suporte estromal seguro.

No extremo oposto desse cenário, podemos imaginar que todas as interações heterotípicas necessárias para manter a função tecidual normal continuam a operar dentro dos carcinomas, sendo requeridas para células neoplásicas obterem sucesso e multiplicarem-se dentro desses tumores. No entanto, tal descrição não pode ser literalmente verdadeira, pois muitas das características adquiridas que associamos a células cancerosas (Capítulo 2), incluindo

Barra lateral 13.1 A localização dos fatores de crescimento é importante para interações heterotípicas adequadas. Altas concentrações localizadas de PDGF são necessárias para assegurar que os pericitos recrutados para as camadas externas dos capilares tornem-se diretamente **opostos** às células endoteliais, e não dispersos aleatoriamente a alguma distância (Figura 13.6C e D). Como muitos outros fatores de crescimento, a molécula de PDGF-B – a forma específica de PDGF que opera nesse caso – contém um “motivo de retenção”, que garante sua ligação aos proteoglicanos da matriz extracelular (ECM). Consequentemente, logo depois de as moléculas de PDGF-B serem secretadas pelas células endoteliais para o espaço ao redor dos capilares, elas são contidas na ECM circundante e se

acumulam em altas concentrações ao lado das células endoteliais. Uma vez liberadas dessa ligação por proteases, as altas concentrações locais resultantes de moléculas de PDGF-B ativadas asseguram o recrutamento de pericitos para locais diretamente adjacentes às células endoteliais. De qualquer forma, em camundongos que expressam um mutante de PDGF-B, o qual não possui esse motivo de retenção, as moléculas de PDGF-B secretadas se difundem para longe das células endoteliais, causando o recrutamento de pericitos para uma área geral das células endoteliais, porém não ao lado oposto delas. Assim, essas células endoteliais não possuem suporte estrutural fornecido pelos pericitos, assim como o suprimento de VEGF por pericitos que é necessário para a sobrevivência da célula endotelial.

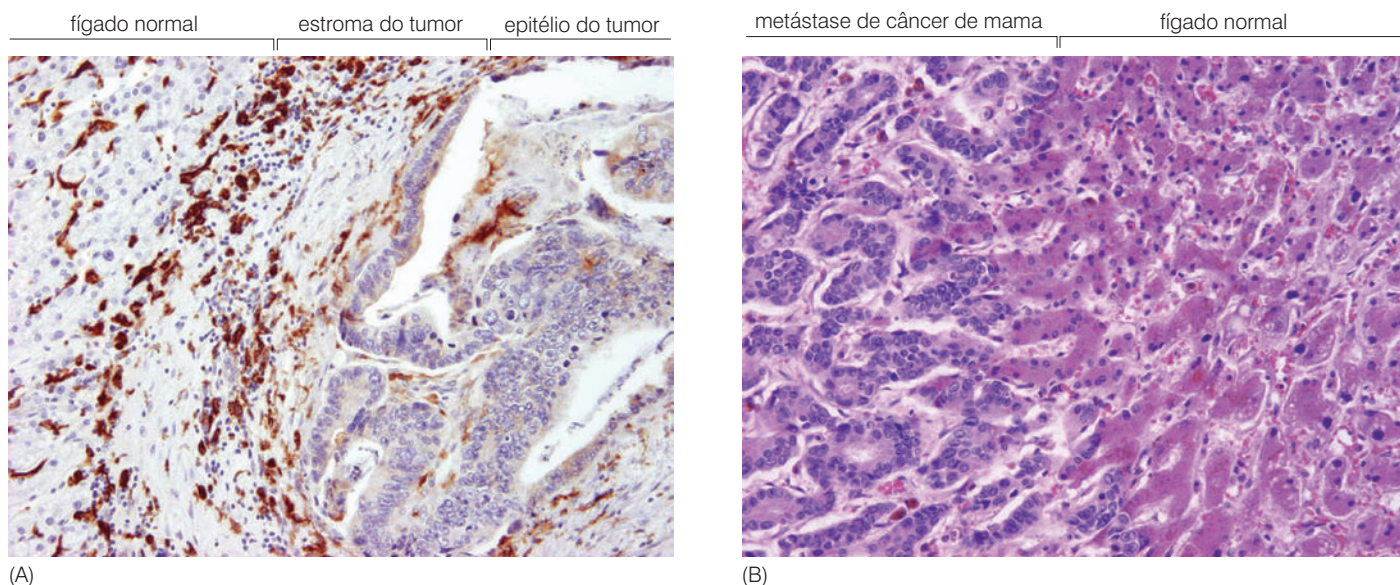


Figura 13.7 Metástase e dependência no estroma (A) Esta micrografia de uma metástase originada a partir de carcinoma de cólon primário revela que a metástase é tão complexa histologicamente como os tumores primários vistos na Figura 13.1. Nesta figura, vemos que as células do carcinoma que formaram uma metástase (*púrpura-claro, direita*) construíram as mesmas estruturas de ductos vistas em adenocarcinomas primários do cólon (veja, por exemplo, a Figura 13.1B). Além disso, as células do carcinoma têm recrutado estroma substancial (*centro*), que inclui macrófagos (*marrom-escuro*). (B) A maioria dos cânceres de mama gera metástases no fígado (*esquerda*) e comporta-se bastante diferentemente da metástase nesse mesmo órgão gerada por carcinoma de cólon, no qual o carcinoma mamário se infiltra para o tecido normal do fígado (*direita*) e substitui os hepatócitos residentes, levando vantagem do estroma existente, incluindo sua vascularização. Essas células metastáticas parecem ser tão dependentes do suporte do estroma quanto as células do carcinoma colorretal (A), porém adquirem isso de maneiras totalmente diferentes. (De F. Stessels, G. van den Eyden, I. van der Auwera et al., *Brit. J. Cancer* 90:1429-1436, 2004.)

uma dependência diminuída de mitógenos, uma resistência aumentada a apoptose e aquisição de independência por ancoragem, certamente afetam as interações entre os compartimentos epiteliais e estromais e diminuem sua interdependência. Com isso, concluímos que esses traços adquiridos *reduzem* a dependência de células cancerosas epiteliais no estroma, mas não parecem *eliminar*-la.

13.2 As células que formam linhagens de células cancerosas se desenvolvem sem interações heterotípicas e desviam do comportamento de células de tumores humanos

A dependência contínua de células do carcinoma pelo suporte estromal explica as enormes dificuldades que pesquisadores têm experimentado ao tentar adaptar células tumorais para condições de cultura *in vitro*. Seu objetivo tem sido criar linhagens de células cancerosas – populações de células cancerosas que podem se propagar indefinidamente em cultura. Para tal, células são preparadas diretamente a partir de biópsias de tumores e colocadas em cultura, com a esperança de que colônias de crescimento vigoroso de células cancerosas irão finalmente emergir em placas de cultura. Na maioria dos casos, entretanto, tais colônias de células não aparecem, frustrando tentativas de gerar linhagens de células de carcinoma. Mais frequentemente do que não, as células que obtêm sucesso em culturas são de origem estromal – especificamente os fibroblastos cujo crescimento é favorecido pelo fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) que está presente como componente do soro de meio de cultura padrão de tecido.

Está claro que células de carcinoma humano propagadas sob condições-padrão de cultura de tecido estão sendo forçadas a proliferar em um ambiente muito diferente daquele experimentado por seus ancestrais que residiam nos tumores de pacientes com câncer. Por exemplo, a alta concentração de soro presente na maioria dos meios de cultura é inibidora de crescimento para muitos tipos de células epiteliais normais e neoplásicas, que raramente experimentaram altas concentrações de fatores associados ao soro *in vivo*, exceto agudamente depois de lesão. Ainda mais importante, células de carcinoma estão sendo selecionadas por sua habilidade de se proliferar *in vitro* sem contato íntimo com o estroma, já que o próprio equilíbrio entre as células epiteliais e estromais presentes em tumores não pode ser mantido nas placas de cultura de tecidos.

Em raras ocasiões, proliferações vigorosas de colônias de populações de células de carcinomas de fato emergem, seguindo cultura extensa de fragmentos de tumores em placas de Petri. Em função de terem sido selecionadas *in vitro* por sua habilidade de crescerem autonomamente,

e, assim, independentemente de suporte estromal, tais células cancerosas têm se desenvolvido além do estágio de progressão tumoral que é alcançado *in vivo* por células neoplásicas na maioria dos tumores humanos. De fato, muito do sucesso em estabelecer linhagens de células tumorais humanas depende da cultura de células a partir dos poucos tumores que já progrediram *in vivo* para um estágio em que não mais dependem do estroma para sua sobrevivência e proliferação.

Tais linhagens de células humanas cancerígenas – existem diversas de uso comum – são reagentes-padrão utilizados em muitos tipos de pesquisas com câncer. Todas essas células virtualmente podem ser implantadas em camundongos hospedeiros imunocomprometidos, nos quais elas proliferam, muitas vezes vigorosamente, e formam tumores. Esses tumores são freqüentemente chamados de **xenoenxertos**, já que resultam de enxertos de tecidos de uma espécie para um animal hospedeiro de outra. Camundongos das linhagens Nude, NOD/SCID e RAG1/2, que não possuem sistema imune funcional, são utilizados nesses experimentos, pois toleram o crescimento de células geneticamente estranhas introduzidas. O xenoenxerto tumoral resultante que cresce nesses camundongos pode então ser testado pela responsividade a drogas anticâncer sob desenvolvimento (Barra lateral 13.2). O resultado de tais experimentos não é necessariamente preditivo de eventuais repostas clínicas a essas drogas.

13.3 Tumores restabelecem tecidos lesados que não cicatrizam

Como argumentado anteriormente, a sinalização heterotípica governa muito da biologia dos carcinomas, e modelos experimentais de câncer que ignoram esse importante processo geraram tumores que são biologicamente muito diferentes daqueles encontrados em pacientes com câncer. Agora procedemos para examinar em maiores detalhes a natureza dessa sinalização entre tumores e os tipos celulares que participam desse processo. Na verdade, as interações heterotípicas que operam nos tumores são altamente complexas e envolvem a troca de dúzias de espécies moleculares distintas que medeiam a sinalização entre células, entre os vários tipos celulares, que juntos formam esses crescimentos. De maneira importante, muitos desses sinais não são rotineiramente alterados pelos tipos celulares que constituem o tecido não-danificado normal, sendo, portanto, vistos em um primeiro momento como exclusivos de tumores.

Essa complexidade levanta algumas questões fundamentais: como células cancerosas aprendem a liberar e responder a uma ordem de sinais heterotípicos diversos? Estão os programas complexos de sinalização e as respostas biológicas resultantes inventadas novamente sendo unidos pedaço por pedaço cada vez que células normais desenvolvem-se progressivamente para células cancerosas? Ou células cancerosas exploram programas biológicos preexistentes que em geral são usados por tecidos com outros objetivos?

Uma solução atrativa para essas questões veio de uma percepção adquirida em 1986. Um pesquisador estudando a aparência histopatológica tanto de tumores como de injúrias notou uma semelhança impressionante entre muitos processos de sinalização envolvidos na progressão do tumor e aqueles que ocorrem durante a cicatrização de uma lesão. Se as similaridades entre esses dois programas biológicos poderiam de fato ser documentadas, isso explicaria bastante a expertise das células tumorais: elas simplesmente ativam um complexo programa fisiológico normal – de cicatrização de lesão – que já está codificado em seus genomas. Acesando e explorando esse programa biológico preexistente, é distribuída às células cancerosas a tarefa de reinventar isso cada vez que um tumor surgir.

A cicatrização da lesão tem sido estudada mais extensivamente no contexto da pele. Seguindo a formação de uma lesão superficial da pele e tecidos basais, plaquetas sangüíneas se agregam e liberam grânulos contendo, dentre outros fatores, fatores de crescimento derivados de plaquetas (PDGF) e fatores de crescimento de transformação β (TGF- β ; veja a Figura 5.3). A lesão também causa liberação de fatores **vasoativos**, os quais aumentam a permeabilidade de vasos sangüíneos próximos da lesão. Isso ajuda o sítio da lesão a adquirir moléculas de fibri-

Barra lateral 13.2 O desenvolvimento de terapias anticâncer tem sido servido imperfeitamente pelo uso de linhagens de células cancerígenas humanas Linhagens de células cancerígenas humanas, quando crescidas como xenoinxertos tumorais em camundongos imunocomprometidos, freqüentemente respondem aos efeitos antiproliferativos tanto de drogas citotóxicas não-alvo (que afetam um amplo espectro de tipos celulares neoplásicos e normais) como de drogas que são desenhadas para atingir apenas células cancerosas. De qualquer maneira, a habilidade desses modelos de xenoinxertos de prever as respostas dos pacientes a tais drogas é limitada. Um estudo retrospectivo feito em 2001, de 39 diferentes drogas anticâncer mostrou uma fraca correlação entre as respostas de tumores xenoinxertados a essas drogas e as respostas dos pacientes a essas drogas observadas na clínica de oncologia. Por exemplo, drogas candidatas que foram efetivas em parar o crescimento de mais de um terço de uma coleção disparada de xenoinxertos tumorais de camundongo tiveram apenas 50% de probabilidade de mostrar qualquer atividade terapêutica (incluindo parada de crescimento tumoral) em alguns tipos de tumores humanos tratados na clínica. Além disso, drogas que afetaram proporções pequenas dos modelos de xenoinxertos de camundongo não tiveram nenhuma atividade essencial significativa na clínica.

Os resultados desapontantes não surpreenderam, levando em consideração que linhagens de células tumorais humanas comumente

usadas em tais experimentos de testes de drogas sustentam pouca semelhança com as células nos tumores freqüentemente encontrados na clínica oncológica. Assim, os tumores que essas linhagens celulares formam com freqüência são histologicamente bastante diferentes daqueles rotineiramente encontrados nos laboratórios de patologia clínica.

Outra dificuldade surge do fato de que células de várias linhagens celulares de tumores humanos em geral são implantadas em camundongos subcutaneamente (abaixo da pele). Enquanto essa localização permite a pesquisadores monitorar prontamente o crescimento desses tumores, ela quase sempre corresponde a um local **ectópico** no hospedeiro, ou seja, uma localização anatômica bastante diferente daquela na qual as células cancerosas inicialmente se desenvolveram. Por exemplo, células de carcinoma pancreático podem comportar-se diferentemente quando crescem abaixo da pele do que quando são implantadas no pâncreas do animal hospedeiro, seu local **ortotópico** natural, aparentemente porque o ambiente estromal dessas duas localizações são muito diferentes. Similarmente, células de câncer de mama podem gerar tumores que têm mais semelhança histológica com tumores de mama clínicos se elas forem implantadas no bloco de gordura do estroma mamário em vez de em outras localizações.

Pesquisa em células-tronco cancerosas sugere agora outra diferença entre linhagens de células cancerosas e populações de células neoplásicas de tumores humanos, essa não-relacionada com interações heterotípicas: se tumores de

ocorrência comum são organizados de maneira hierárquica, envolvendo células-tronco cancerosas e células amplificadoras em trânsito com capacidade limitada de se auto-renovar, essa organização provavelmente não é restabelecida por linhagens celulares cancerosas que são propagadas *in vitro* (veja a Seção 11.6).

Uma resposta experimental a essas dificuldades envolve a tentativa de introduzir fragmentos de tumores diretamente em camundongos imunocomprometidos sem intervir na propagação na cultura de tecido. Esses enxertos tumorais implantados contêm tanto células estromais como epiteliais, as quais podem se co-proliferar para formar tumores histologicamente complexos em camundongos hospedeiros que se parecem com os tumores originais dos quais derivaram (veja a Figura 13.8). Infelizmente, entretanto, como as células cancerosas em tumores humanos normais, as células nesses xenoinxertos normalmente se proliferam muito lentamente, e sua propagação envolve trabalho intensivo no transplante de um animal hospedeiro para o outro. Essas propriedades impedem seu uso rotineiro em testes de drogas anticâncer.

A imperfeição de modelos de tumores humanos disponíveis atualmente e a resultante inabilidade de se prever com certeza quão efetivas serão as drogas anticâncer (antes de serem utilizadas em humanos) custa para as indústrias farmacêuticas centenas de milhões de dólares anualmente e assim representam um dos maiores impedimentos no desenvolvimento de novas drogas anticâncer.

nogênio a partir do plasma sangüíneo, o qual, quando convertido em fibrina, cria o esqueleto do coágulo sangüíneo (Figura 13.9). Os feixes de fibrina resultantes, que se tornam entrelaçados ao redor das massas de plaquetas, ajudam a estancar a hemorragia.

O PDGF liberado pelas plaquetas atrai fibroblastos e estimula sua proliferação (Figura 13.10). Logo após, TGF- β derivado de plaquetas ativa esses fibroblastos e os induz a liberar uma classe de proteases secretadas chamadas **metaloproteinases de matriz** (MMPs; veja a Tabela 13.1). Diferentemente da maioria das proteases secretadas, que possuem uma serina no seu sítio catalítico, as MMPs carregam íons de zinco para ajudar na catálise; de fato, esses íons inspiraram seu nome. Fibroblastos ativados também secretam mitógenos, assim como vários fatores de crescimento de fibroblastos (FGFs) que podem estimular a proliferação de certas células epiteliais.

Uma vez liberadas, as MMPs começam a degradar componentes específicos da matriz extracelular (ECM; Tabela 13.1). Essa degradação tem duas consequências maiores. Por um lado, ela permite a remodelagem estrutural da ECM, abrindo, assim, espaço para novas células. Por outro lado, isso resulta na liberação de uma variedade de fatores de crescimento que foram ligados em uma forma inativa aos proteoglicanos da ECM e agora se tornaram solúveis e ativados. Incluídos entre esses estão os fatores de crescimento de fibroblastos básicos (bFGF),

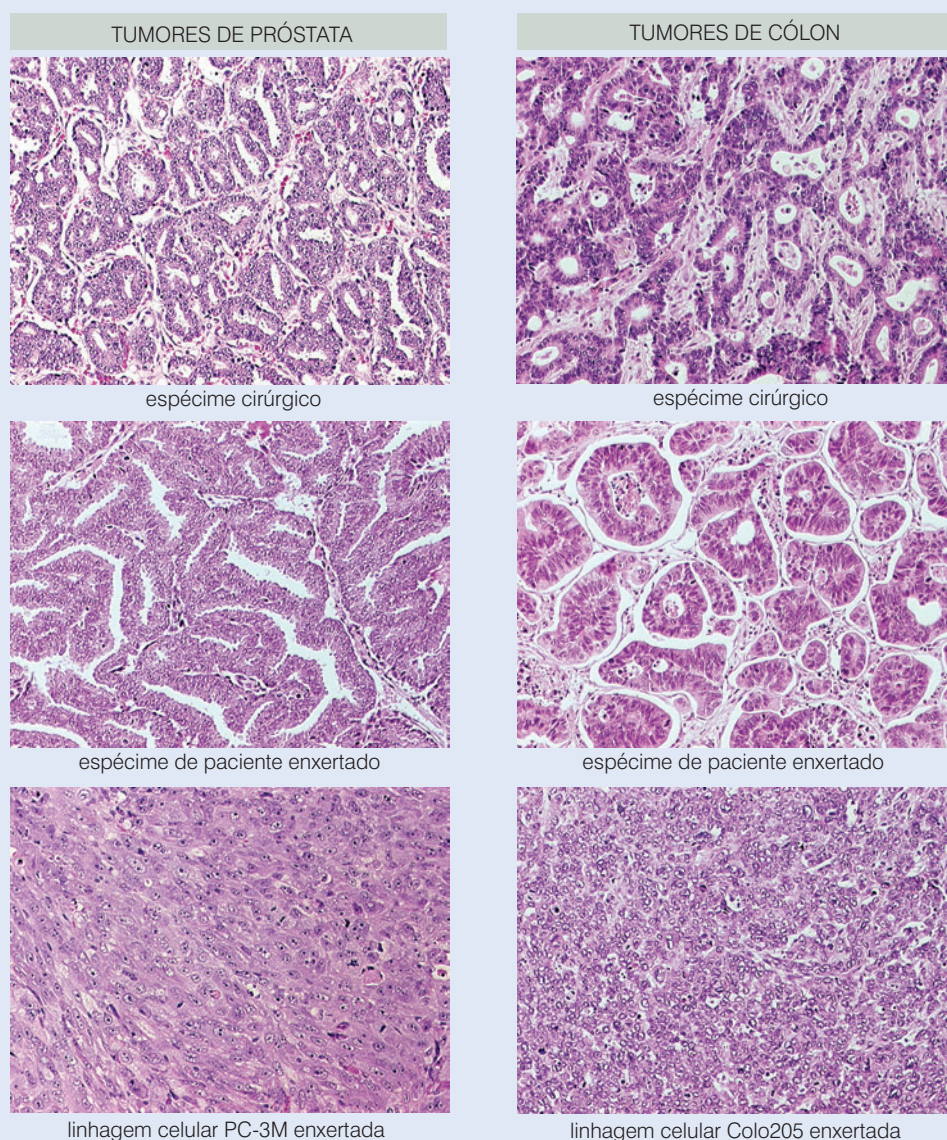


Figura 13.8 Tumores e linhagens celulares tumorais de xenoenxertos derivadas A histologia de um carcinoma de próstata primário (*esquerda*) e de um carcinoma de cólon (*direita*) que foram removidos cirurgicamente de pacientes são mostrados na linha superior. Abaixo destes (*linha do meio, esquerda, direita*) estão as histologias emergentes da implantação de blocos de tumores em sítios subcutâneos em camundongos imunocomprometidos SCID; esses blocos contêm tanto componentes tumorais epiteliais como estromais. De 3 a 6 meses após a implantação, essas amostras tumorais enxertadas, as quais cresceram de 2 mm a 1 cm de diâmetro, continuam mantendo a arquitetura dos tumores primários dos quais derivaram. Entretanto, uma linhagem celular de câncer de próstata e de cólon (*linha inferior, esquerda, direita*), que foi propagada extensivamente *in vitro* como populações de células cancerosas puras, gerou pequenas semelhanças histológicas com os tumores tipicamente encontrados na clínica oncológica e mostrados na linha superior. (Cortesia de B. L. Hylander e E. A. Repasky.)

TGF- β 1, PDGF, inúmeros fatores relacionados a EGF e interferon- γ (IFN- γ). (Além disso, foi observado que virtualmente cada MMP age em uma variedade de proteínas não-MMC no espaço extracelular; entre esses substratos, estão as formas latentes de **pro-enzimas** de outras proteases, as quais são convertidas em enzimas ativas seguindo clivagem por MMPs.)

Os fatores de crescimento liberados por plaquetas e aqueles mobilizados a partir da ECM então atraem **monócitos**, macrófagos e uma outra classe de fagócitos, chamados **neutrófilos**, os quais infiltram o sítio da lesão. (Ainda outros tipos de células imunes, incluindo **eosinófilos**, **mastócitos** e **linfócitos**, são também recrutadas para esse sítio.) Essas células recrutadas limpam e removem matéria estranha, bactérias e fragmentos teciduais do sítio da lesão; ao mesmo tempo, elas liberam e ativam fatores mitogênicos, como fatores de crescimento de fibroblastos (FGFs) e fator de crescimento vascular endotelial (VEGF; veja também a Seção 7.12). Tais fatores procedem estimulando células endoteliais na vizinhança a se multiplicar e construir novos capilares – o processo da **angiogênese** (algumas vezes chamado de **neoangiogênese**).

Enquanto tudo isso está ocorrendo amplamente na região estromal de um sítio de lesão, as células epiteliais ao redor da margem da lesão estão sofrendo suas próprias alterações. Seu

Figura 13.9 EM de varredura de um coágulo sanguíneo Esta micrografia eletrônica de varredura, a qual foi colorida, mostra que coágulos são compostos de densas redes de fibras de fibrinas (*marrom-claro*) que capturaram plaquetas (*vermelho*). Antes de coagular, as plaquetas sofrem ativação que conduz a liberação dos grânulos, vistos na Figura 5.3. (CNRI/Photoresearchers; cortesia de J. Weisel, Philadelphia.)

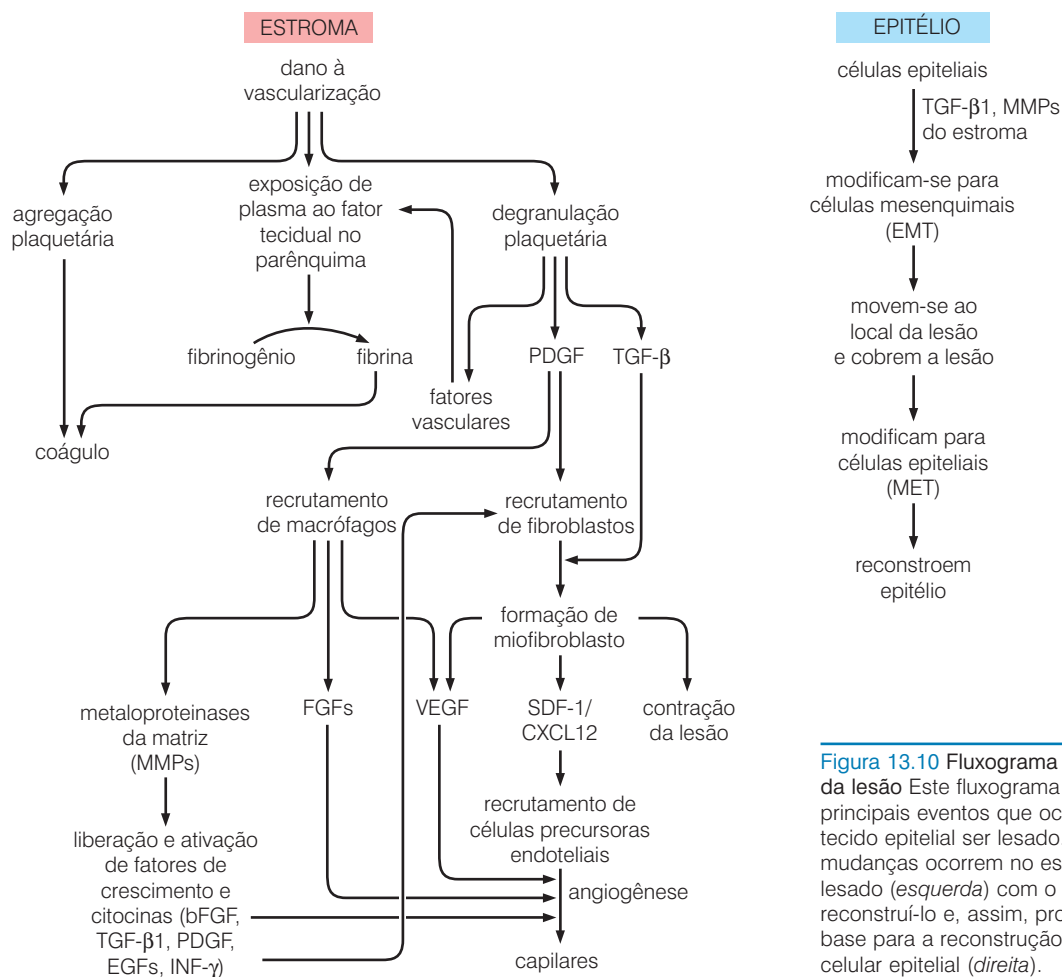
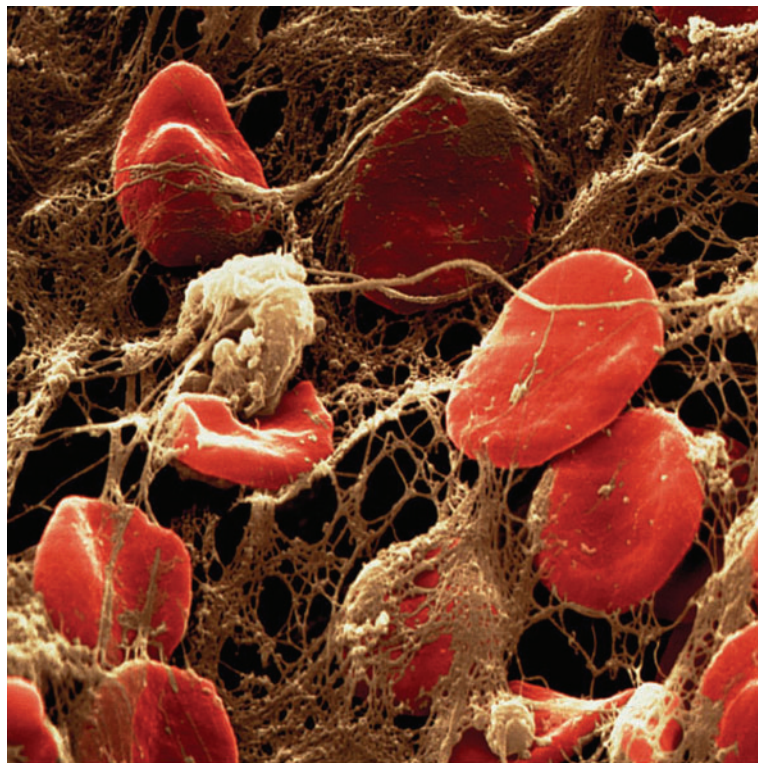


Figura 13.10 Fluxograma de cicatrização da lesão Este fluxograma indica vários dos principais eventos que ocorrem após um tecido epitelial ser lesado. Muitas das mudanças ocorrem no estroma do tecido lesado (*esquerda*) com o intuito de reconstruí-lo e, assim, providenciar uma base para a reconstrução da camada celular epitelial (*direita*).

Tabela 13.1 Algumas metaloproteínas de matriz e seus substratos da matriz extracelular

Nome da MMP	Nome alternativo da MMP	Substrato de ECM ^a
MMP-1	colagenase – 1	diversos colágenos, gelatina, entactina, agrecan, tenascina
MMP-2	gelatinase – A	elastina, fibronectina, diversos colágenos, laminina, agrecan, vitronectina
MMP-3	estromelisinase – 1	proteoglicanos, laminina, fibronectina, gelatina, diversos colágenos, fibrinogênio, entactina, tenascina, vitronectina
MMP-7	matrilisina	mesmo que MMP-3
MMP-9	gelatinase B	mesmo que MMP-2
MMP-11	estromelisinase – 3	serpina inativa

^aEm adição aos substratos de ECM, a maioria das MMPs também cliva outros substratos presentes no espaço extracelular. Por exemplo, foi reportado que MMP-3 cliva pro-HB-EGF, pro-IL-1 β , plasminogênio, E-caderina, IGFBP-3, α 1-antiquimiotripsina, inibidor α -1 proteinase, pro-MMPs-1,-3,-7,-8,-9 e-13 e pro TNF- α .

Adaptada de L.J. McCawley e L.M. Matrisian, *Curr. Opin. Cell Biol.* 13:534-540, 2001.

objetivo é reconstruir a camada epitelial que existia antes da lesão. Para tanto, células epiteliais reduzem sua adesão a ECM, especialmente a membrana basal (Seção 2.2 e Figura 2.3) que as separa do compartimento estromal (Figura 13.5 e 13.11). Pelo rompimento dessas conexões, as células epiteliais ganham mobilidade aumentada.

As células epiteliais também separam suas ligações umas das outras. Essas associações lado-a-lado são estabilizadas, em parte, por **junções aderentes** (Figura 13.12), as quais são unidas como associações de moléculas de E-caderina que são mostradas por células epiteliais adjacentes e ligam as membranas plasmáticas adjuntas das células umas às outras. De acordo com isso, a expressão de E-caderina é suprimida nas células epiteliais que estão situadas ao redor da margem de um sítio de lesão, e ela é freqüentemente substituída por N-caderina, outra molécula de adesão célula-célula que é normalmente mostrada por células mesenquimais, especialmente fibroblastos. (Essas moléculas de N-caderina, apesar de relacionadas estruturalmente a E-caderina, não reestabelecem junções aderentes entre as células epiteliais, já que elas se ligam muito mais fracamente uma à outra.)

Enquanto alteram a disposição de caderinas na superfície celular, as células epiteliais na margem de uma lesão sofrem uma alteração maior no fenótipo, que lhes causa, pelo menos superficialmente, uma aparência fibroblástica (Figura 13.13). Essa alteração profunda é chamada de **transição mesenquimal-epitelial** (EMT) e permite que as células epiteliais se tornem móveis e invasivas. As características adquiridas durante a EMT permitem que essas células se movam para o sítio da lesão, onde preenchem a lacuna no epitélio criada pela lesão.

Células do estroma no sítio da lesão ajudam a desencadear a EMT de células epiteliais ao redor. As metaloproteínas da matriz (MMPs) secretadas por células do estroma liberam e ativam fatores de crescimento latentes, como TGF- β 1, que foram armazenados na matriz extracelular. De maneiras que são pouco compreendidas, esses fatores liberados parecem estimular e reforçar a expressão do programa de EMT em células epiteliais. De modo importante, a EMT é somente uma troca temporária no fenótipo da célula. Depois que as células

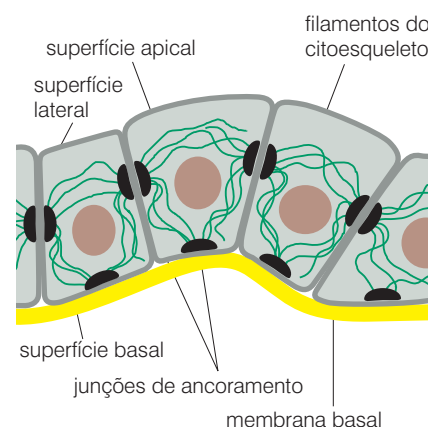


Figura 13.11 Ligação de células epiteliais às estruturas ao seu redor. Células epiteliais são ancoradas por meio de suas superfícies basais à base da membrana basal subjacente (amarelo) e às células epiteliais adjacentes por meio de suas superfícies laterais, que formam diferentes tipos de conexões (junções de ancoramento, preto) que fisicamente amarram o citoesqueleto de células vizinhas (linhas verdes) uns aos outros; estas ligações do citoesqueleto envolvem tanto os filamentos de actina como componentes do microtúbulo. (De B. Alberts et al., *Molecular Biology of the Cell*, 4th ed. New York: Garland Science, 2002.)

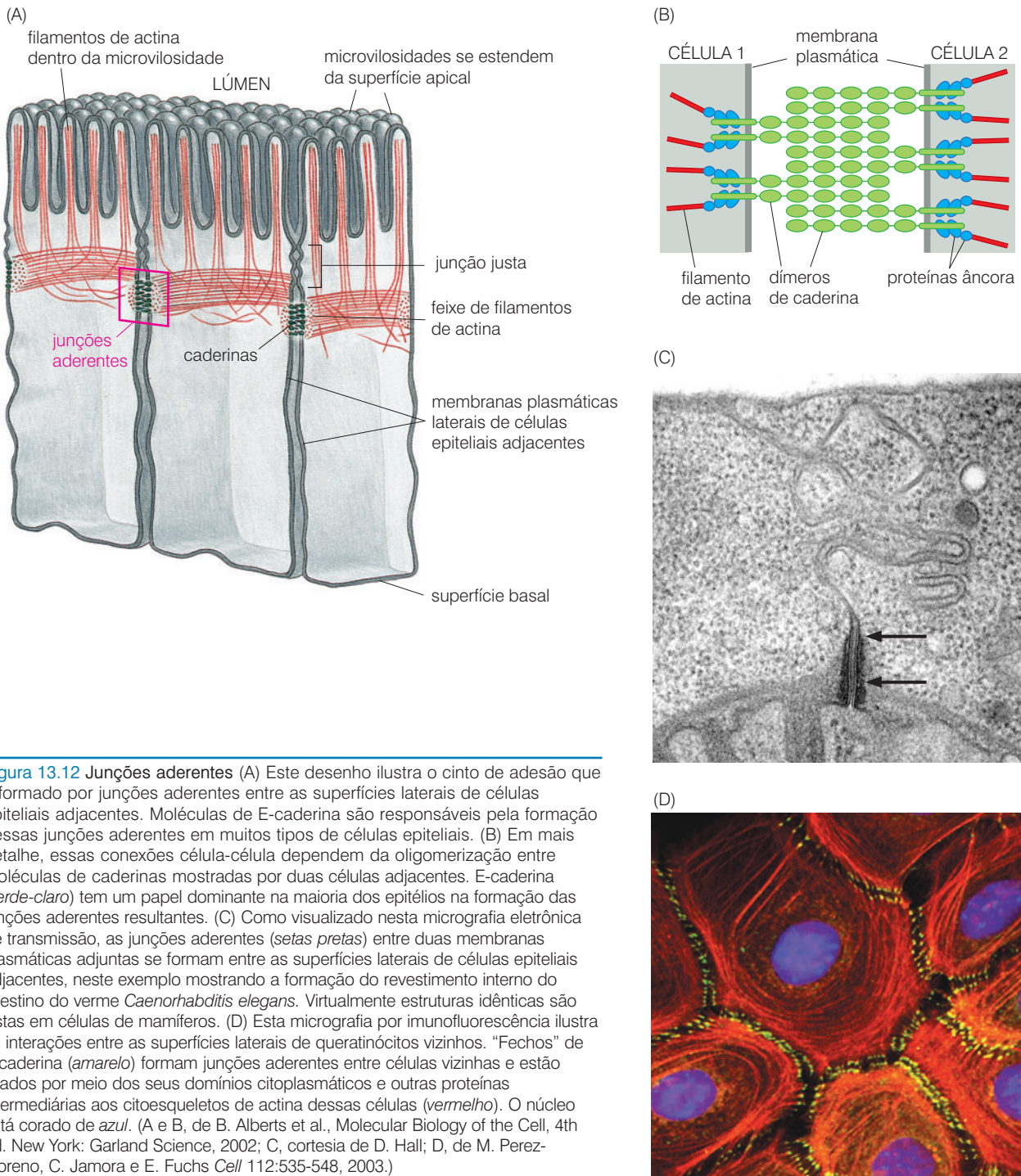


Figura 13.12 Junções aderentes (A) Este desenho ilustra o cinto de adesão que é formado por junções aderentes entre as superfícies laterais de células epiteliais adjacentes. Moléculas de E-caderina são responsáveis pela formação dessas junções aderentes em muitos tipos de células epiteliais. (B) Em mais detalhe, essas conexões célula-célula dependem da oligomerização entre moléculas de caderinas mostradas por duas células adjacentes. E-caderina (verde-claro) tem um papel dominante na maioria dos epitélios na formação das junções aderentes resultantes. (C) Como visualizado nesta micrografia eletrônica de transmissão, as junções aderentes (setas pretas) entre duas membranas plasmáticas adjuntas se formam entre as superfícies laterais de células epiteliais adjacentes, neste exemplo mostrando a formação do revestimento interno do intestino do verme *Caenorhabditis elegans*. Virtualmente estruturas idênticas são vistas em células de mamíferos. (D) Esta micrografia por imunofluorescência ilustra as interações entre as superfícies laterais de queratinócitos vizinhos. "Fechos" de E-caderina (amarelo) formam junções aderentes entre células vizinhas e estão ligados por meio dos seus domínios citoplasmáticos e outras proteínas intermediárias aos citoesqueletos de actina dessas células (vermelho). O núcleo está corado de azul. (A e B, de B. Alberts et al., Molecular Biology of the Cell, 4th ed. New York: Garland Science, 2002; C, cortesia de D. Hall; D, de M. Perez-Moreno, C. Jamora e E. Fuchs *Cell* 112:535-548, 2003.)

em migração se moveram para a posição e cobriram o sítio da lesão, elas reconstroem o epitélio pela reversão para um estado epitelial via o programa chamado de **transição epitelial-mesenquimal** (MET). Como consequência, uma vez que a cicatrização da lesão está completa, as células no epitélio reconstituído não apresentam características de terem passado transitoriamente por um estado mesenquimal.

Se compararmos esses processos (Figura 13.14) com as interações de células cancerosas epiteliais e suas vizinhas do estroma, encontramos relações impressionantes entre cicatrização de lesão e tumorigênese. Uma similaridade clara entre os dois processos deriva da presença de

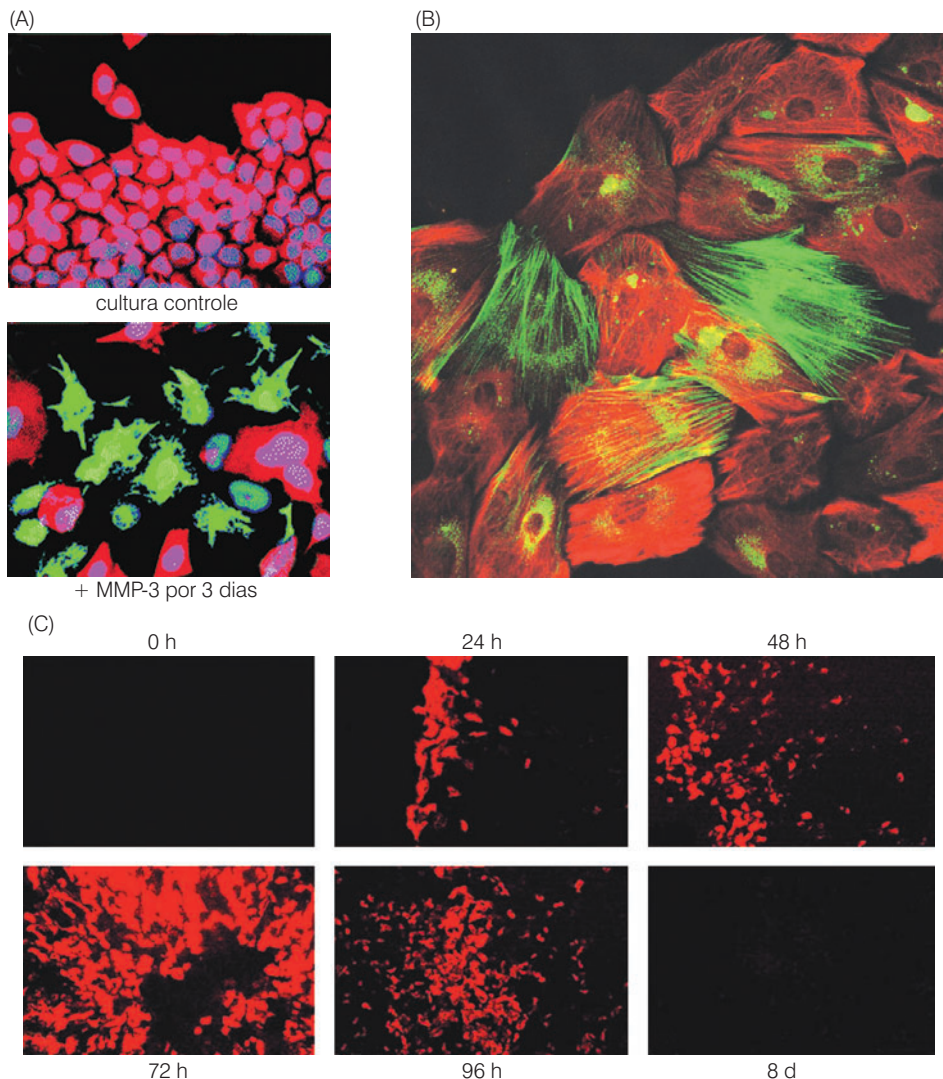
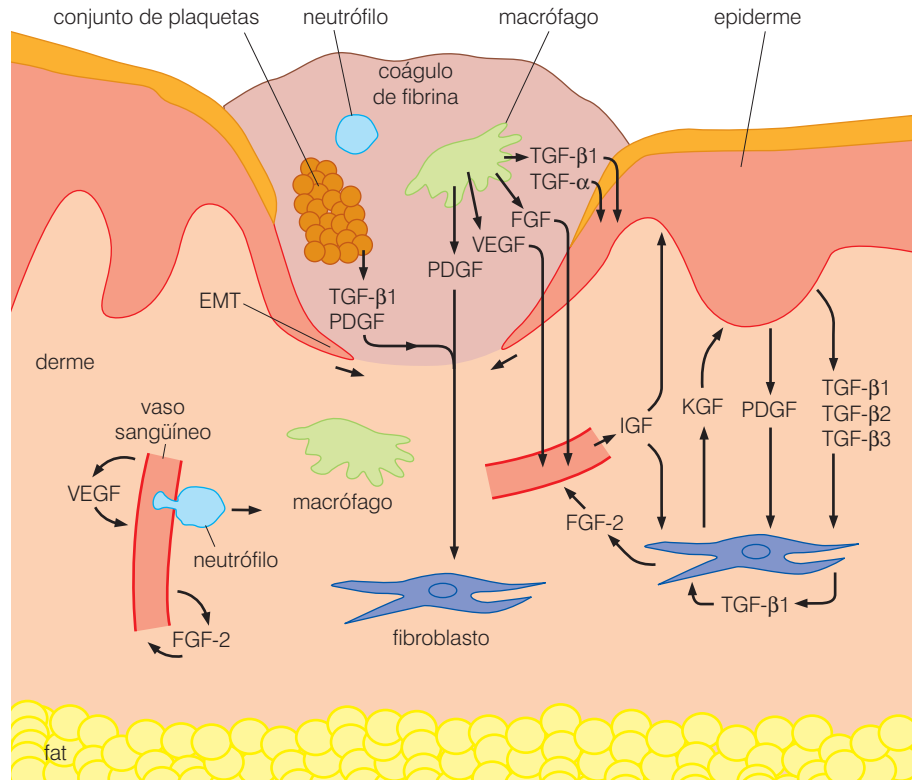


Figura 13.13 A transição epitelial-mesênquimal. Quando células epiteliais em cultura de camada celular única passam por uma transição epitelial-mesênquimal (EMT), elas inibem a expressão de muitos marcadores de células epiteliais típicos, como citoqueratinas (vermelho) e E-caderina, e induzem a expressão de proteínas mesênquimais, como vimentina (verde), fibronectina e N-caderina. Além disso, elas alteram sua forma tipicamente poligonal (acima) para uma forma fibroblástica (abaixo) e frequentemente adquirem motilidade e invasividade. Neste caso, o EMT foi provocado por uma exposição de 3 dias à metaloproteinase-3 de matriz (MMP-3), a qual pode iniciar a EMT por sua habilidade de degradar E-caderina. (B) Em alguns tipos celulares em cultura, células individuais podem espontaneamente alterar de um fenótipo epitelial, indicado pela expressão de citoqueratina (vermelho), para um fenótipo mesênquimal, indicado pela expressão da actina α do músculo liso (verde). Isso espelha uma plasticidade que é aparente em algumas células durante o início da embriogênese. (C)

Uma camada celular única confluenta de células MCF10A, uma linhagem de células epiteliais mamárias (MECs) de humanos não-transformada e imortalizada, tem sido perturbada pela remoção de um pedaço dessa monocamada de células (*removida da esquerda de cada imagem*). Inicialmente, nenhuma vimentina é expressada por essas células. Entretanto, logo depois que a camada única foi lesada, as células epiteliais que estavam na margem da lesão sofrem uma EMT parcial, expressam vimentina (característica de células mesênquimais; *vermelho*), migram para o local da lesão e o preenchem. Após oito dias, tempo em que a camada celular foi reconstituída, essas células reverterem para um fenótipo epitelial completo e inibem a expressão de vimentina (indicando uma transição epitelial-mesênquimal, uma MET). (A, de M.D. Sternlich, A. Lochter, C.J. Symptom et al., *Cell* 98: 137-146, 1999; B, de O. W. Petersen, H. L. Nielsen, T. Gudjonsson et al., *Am. J. Pathol.* 162:391-402, 2003; C, de C. Gilles, M. Polette, J. M. Zahm et al., *J. Cell Sci.* 112:4615-4625, 1999.)

Figura 13.14 O programa de cicatrização de lesão Este modelo descreve esquematicamente a sinalização heterotípica que ocorre depois de a pele, um tecido epitelial típico, ter sido lesionada. No sítio da lesão, um coágulo de fibrina que carrega plaquetas preencheu inicialmente o local da lesão. O terceiro dia do processo de cicatrização da lesão é algumas vezes chamado de fase inflamatória, por causa do envolvimento de vários tipos celulares que geralmente estão associados com a inflamação, notavelmente neutrófilos e monócitos; elas estão envolvidas na remoção de fragmentos celulares, do coágulo e de bactérias invasoras. Além disso, macrófagos que derivam da diferenciação de monócitos liberam TGF- β 1 e TGF- α ; esses fatores estimulam a proliferação de células epiteliais a partir da epiderme e as induzem a sofrer uma transição epitelial-mesenquimal (EMT). Lingüetas dessas células, agora exibindo comportamento mesenquimal, estão invadindo abaixo do coágulo por ambos os lados com o objetivo de cobrir o local da lesão. Ao mesmo tempo, TGF- β 1 e PDGF-A e B, os quais foram liberados pelas plaquetas durante a formação inicial do coágulo, estão estimulando a proliferação dos fibroblastos no estroma da dermal subjacente e induzindo-os a se converterem em miofibroblastos (*não-mostrado*); devido à sua contratilidade, os miofibroblastos irão unir os lados da lesão. Miofibroblastos também liberam fatores angiogênicos, notavelmente VEGFs e FGF-2 (fator de crescimento de fibroblastos 2), os quais estimulam a formação de novos vasos sanguíneos no estroma localizado abaixo do sítio da lesão. Finalmente, depois de o estroma lesionado ter sido recoberto, as células que previamente sofreram uma EMT reverterem, por uma transição epitelial-mesenquimal, (MET) para um estado epitelial, reconstituindo assim o epitélio (*não-mostrado*). (De A.J. Singer e R.A.F. Clark, *N. Engl. J. Med.* 341:738-746, 1999.)



massas de fibrina no estroma associado ao tumor. No caso de tumores, isso não deriva de dano traumático dos vasos sanguíneos. Ao contrário, os capilares dentro dos tumores são constitutivamente permeáveis, diferente daqueles em tecidos normais (Figura 13.15A). Mais adiante discutiremos as causas dessa permeabilidade. No momento, basta isso para dizer que a permeabilidade das paredes dos capilares e **vênulas** (pequenas veias) permite que moléculas de fibrinogênio do plasma entrem em contato direto com células cancerosas, o que provoca, por meio de uma série de reações intermediárias, a conversão de fibrinogênio em fibrina e a formação de grandes feixes de fitas de fibrinas (Figuras 13.15B e C).

Muitos tipos de células cancerosas, incluindo aquelas que formam os carcinomas de mama, próstata, cólon e pulmão, continuamente liberam níveis significativos de PDGF. Isso contrasta com a situação em lesões, na qual PDGF é liberado em uma breve explosão pelas plaquetas na medida em que elas formam o coágulo sanguíneo inicial. Como é o caso na cicatrização de lesões, os alvos de PDGF produzidos por células cancerosas são células mesenquimais no estroma que apresentam receptores PDGF, incluindo células da musculatura lisa, fibroblastos e macrófagos. PDGF funciona aqui tanto como um atraiante quanto como um mitógeno para essas células do estroma e parecem ser as moléculas de sinalização mais importantes usadas por células de carcinoma para recrutar e estimular a proliferação de células estromais. Em cânceres de mama, por exemplo, o nível da expressão de PDGF geralmente aumenta com o aumento da progressão tumoral, o que pode explicar o alto grau de **estromatização** de muitos tumores avançados.

O PDGF liberado por células de carcinoma inicialmente tem sucesso em recrutar fibroblastos para a matriz de fibrina. Ao mesmo tempo, a matriz de fibrina (veja a Figura 13.15B e C) promove um importante suporte que ajuda essas células mesenquimais recrutadas a se ligarem, via integrinas, e migrarem. As células estromais invasoras remodelam essa “matriz temporária” pela degradação de muitas das moléculas de fibrina formadas inicialmente e pela substituição destas por uma matriz mais permanente que é organizada a partir do colágeno secretado pelos fibroblastos. Isso compara de perto a sequência de etapas que ocorre durante a cicatrização da lesão.

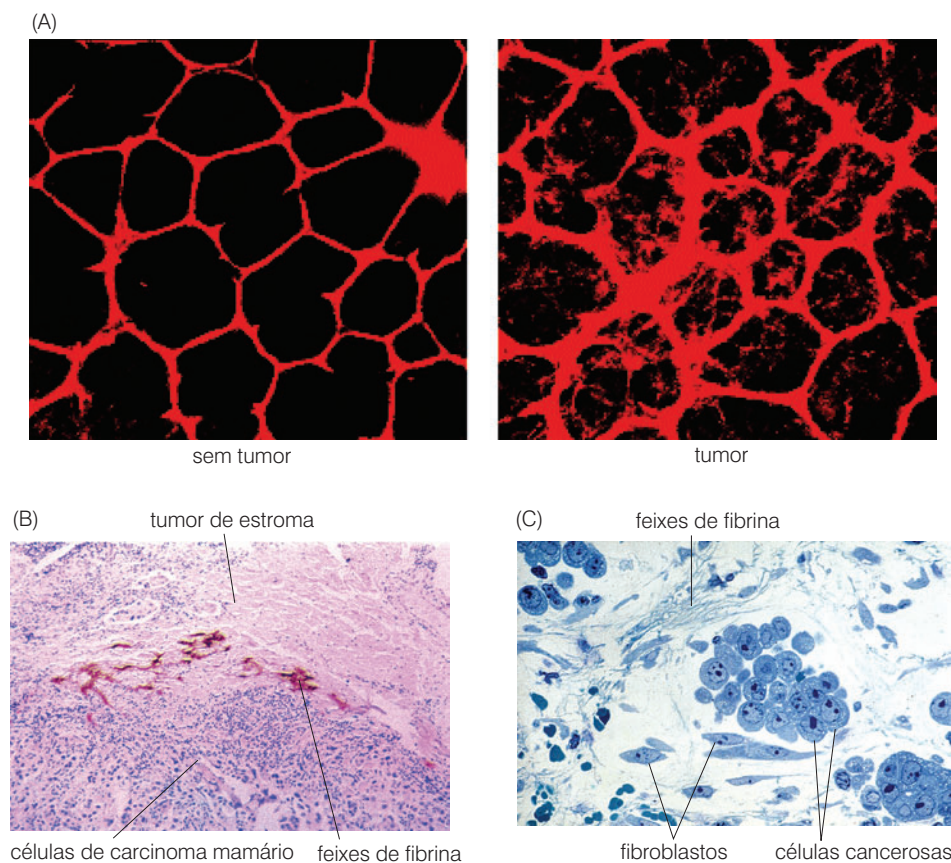


Figura 13.15 Permeabilidade dos capilares e deposição dos feixes de fibrina no estroma associado ao tumor (A) Injeção do corante vermelho dextran na microvasculatura normal revela que as paredes de capilares associados têm uma permeabilidade relativamente baixa, como indicado pelo aspecto bem-delimitado desses vasos (*esquerda*). Entretanto, quando injetado na vasculatura associada a tumores, o corante extravasa dos capilares e difunde para o parênquima próximo, gerando uma coloração difusa fora dos limites dos vasos (*direita*). (B) A permeabilidade da microvasculatura associada a tumor resulta na extravasão contínua de moléculas de trombina e fibrinogênio a partir do plasma para o parênquima que circunda os vasos sanguíneos. O *fator tecidual* é uma proteína disposta na superfície de células cancerosas e muitos outros tipos celulares. A trombina a partir do plasma é ativada pelo contato com o fator tecidual e converte fibrinogênio em fibrina. Isso resulta no extenso emaranhado de feixes de fibrina (*vermelho-escuro*) vistos aqui na borda entre células cancerosas de mama crescendo ativamente (*abaixo*) e o estroma tumoral (*acima*). (C) Os feixes de fibrina (*acima e à esquerda dos agrupamentos de células cancerosas*) formam uma matriz extracelular para a qual as células em migração, como fibroblastos (*agrupamentos de células cancerosas mais abaixo*), assim como células endoteliais (*não-observado*), podem se anexar, usando-a como um substrato no qual elas podem se mover adiante. Em muitos tumores, como neste carcinoma de fígado de origem do ducto biliar de porquinho-da-índia, a matriz de fibrina pode finalmente ser dissolvida pelo processo de *fibrinólise* e substituída por uma matriz de colágeno. (A, cortesia de R. Muschel; B, de C.G. Colpaert, P.B. Vermeulen, P. van Beest et al., *Histopathology* 42:530-540, 2003; C, de H.F. Dvorak, *Am. J. Pathol.* 162:1747-1757, 2003.)

Uma das tarefas das células do estroma na cicatrização da lesão envolve a contração física do local da lesão com o objetivo de fechar a lesão. Essa contração é mediada pela classe especializada de fibroblastos chamada de **miofibroblastos**, os quais expressam actina α da musculatura lisa (α -SMA) e são capazes de usar o sistema de contração miosina-actina (relacionada a um sistema que opera em células musculares) para gerar a tensão mecânica necessária para o fechamento da lesão (Figura 13.16A). Miofibroblastos estão também presentes em sítios de lesão crônica, isto é, tecidos continuamente inflamados (Figura 13.16B). De forma provocativa, essencialmente miofibroblastos idênticos são componentes importantes do estroma presente na maioria dos carcinomas avançados (Figura 13.16C-E).

Alguns dos miofibroblastos associados ao tumor parecem surgir de fibroblastos do estroma normal. De fato, miofibroblastos podem ser produzidos *in vitro* simplesmente por exporem fibroblastos normais a TGF- β 1. Isso sugere que TGF- β 1 liberado por muitos tipos de células do carcinoma, especialmente aqueles que progrediram para níveis mais altos de malignidade, é o principal fator responsável pela formação de miofibroblastos no estroma associado ao tumor. No contexto de lesões, a principal fonte de TGF- β 1 é provavelmente as plaquetas; como mencionado anteriormente, elas liberam grandes quantidades desse fator quando participam da formação do coágulo. As origens de muitos miofibroblastos e fibroblastos estromais não estão claras (Barra lateral 13.3).

O estroma de um tumor formado por miofibroblastos difere substancialmente em aparência do estroma presente em tecidos epiteliais normais. Essas aparências distintas levaram os patologistas a chamá-los de estroma “reativo” ou **desmoplásico**. O último termo refere-se à *rigidez* da massa tumoral como um todo, que resulta da deposição de extensiva matriz extracelular (ECM) pelos miofibroblastos. Com o avanço da progressão do carcinoma para um grau maior e mais agressivo, a proporção do estroma que é desmoplásico frequentemente aumenta em paralelo (Figura 13.17).

Os miofibroblastos constroem o estroma desmoplásico pela secreção de grandes quantidades de colágeno tipos I e III, fibronectina, proteoglicanos e glicosaminoglicanos (GAGs), que, juntos, dão a esse estroma sua aparência característica em nível microscópico. Além disso, essas células secretam o ativador de plasminogênio uroquinase (uPA, uma protease) e uma série de metaloproteinases de matriz (MMPs), que ajudam a mobilizar fatores de crescimento que foram previamente seqüestrados na ECM. Na medida em que o estroma desmoplásico amadurece, muitas das células estromais presentes inicialmente desaparecem, sendo substitu-

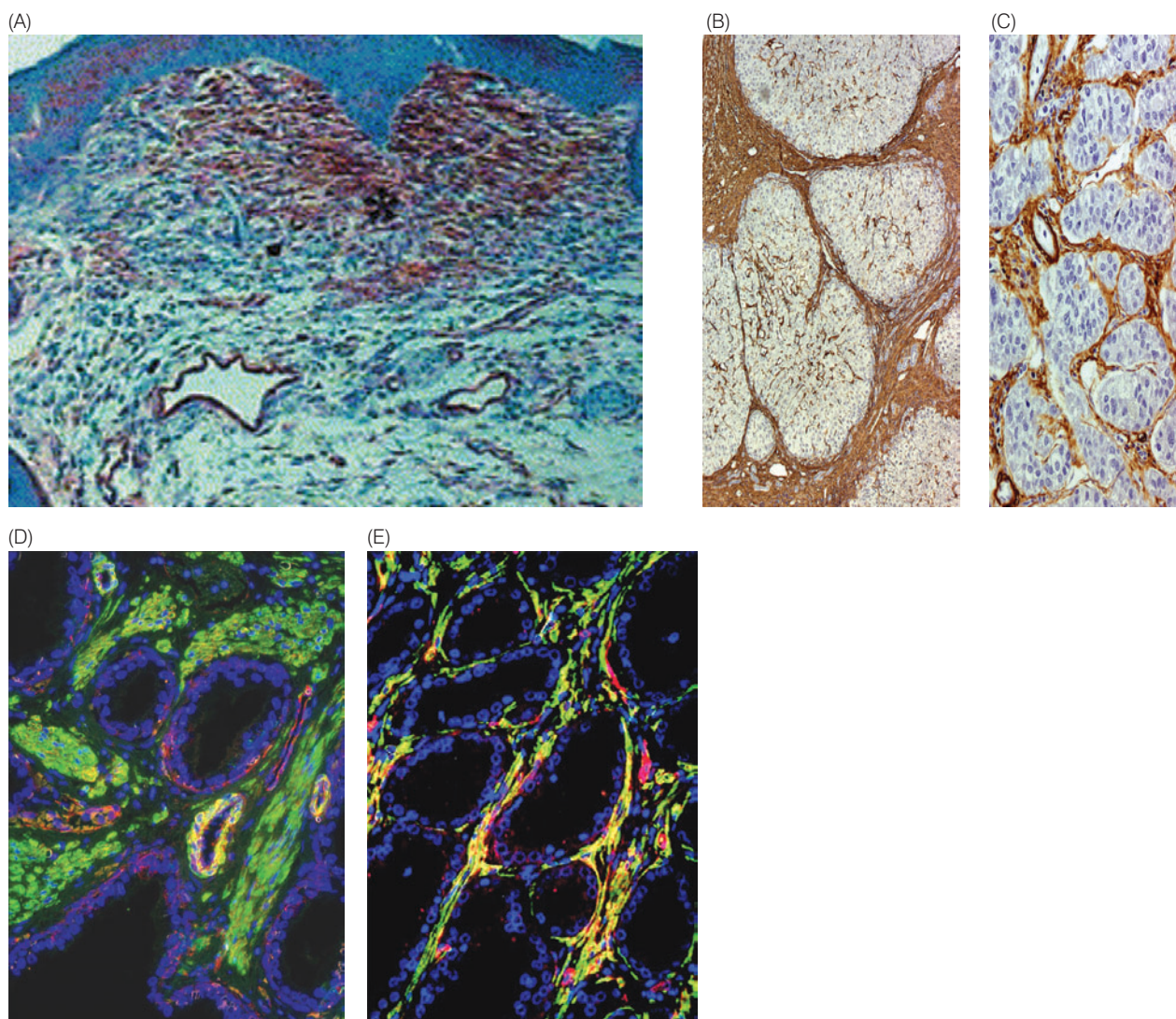


Figura 13.16 Miofibroblastos Miofibroblastos surgem de locais de cicatrização de lesão e no estroma associado a tumores por meio da transdiferenciação dos fibroblastos do estroma e pelo recrutamento de precursores dos miofibroblastos, possivelmente fibrócitos, a partir da circulação. Sua presença é revelada tipicamente pela sua expressão de actina α da musculatura lisa (α -SMA), o antígeno que está sendo marcado aqui. (A) Miofibroblastos α -SMA positivos estão presentes em abundância três dias depois que a pele de um camundongo foi lesionada (*marrom-avermelhado*). (B) Tecidos cronicamente inflamados adquirem um estroma fibrótico, assim como o fígado cirrótico visto aqui marcado por anticorpo anti- α -SMA, o qual revela a presença de numerosos miofibroblastos (*marrom*). (C) Uma secção de carcinoma hepatocelular marcado com anticorpo anti- α -SMA (*marrom*). Isso revela a semelhança nítida do estroma de um tecido cronicamente inflamado com o estroma de um carcinoma que emerge neste tecido. (D) α -SMA (*verde*) é

expressada pelas numerosas células musculares lisas presentes no estroma de glândulas de próstata normais de humanos. Diferentemente dos miofibroblastos, células musculares lisas são conhecidas pela ausência significativa de marcação de vimentina (*vermelho*). As poucas áreas de sobreposição de expressão dessas duas proteínas estão indicadas em *amarelo*; estas representam os pericitos ocasionais que circundam um vaso sanguíneo. O núcleo de células epiteliais que revestem internamente os ductos está em *azul*. (E) Em carcinomas de próstata, ao contrário, o estroma é preenchido com miofibroblastos que expressam tanto vimentina (*vermelho*) como α -SMA (*verde*). A sobreposição entre essas duas está indicada em *amarelo*. Os núcleos de células epiteliais estão indicados em *azul*. (A, de P. Martin, D. D'Souza, J. Martin et al., *Curr. Biol.* 13:1122-1128, 2003; B e C, de A. Desmouliere, A. Guyot e G. Gabbiani, *Int. J. Dev. Biol.* 48:509-517; D e E de J.A. Tuxhorn, G. E. Ayala, M.J. Smith et al., *Clin. Cancer Res.* 8:2912-2923, 2002.)

Barra lateral 13.3 Fibroblastos e miofibroblastos podem ser recrutados à distância. Permanece não solucionada precisamente onde a maioria dos fibroblastos e miofibroblastos se originam. Durante a cicatrização da lesão, fibroblastos podem inicialmente ser recrutados a partir do estroma de tecidos normais adjacentes; miofibroblastos podem então ser produzidos pela transdiferenciação de alguns desses fibroblastos recrutados. De qualquer maneira, uma alternativa intrigante, que ainda será rigorosamente documentada, é que muitos dos miofibroblastos e fibroblastos das lesões derivam dos **fibrócitos** recrutados – células precursoras produtoras de colágeno, menos diferenciadas, que estão pre-

sentes na circulação. Sabe-se que fibrócitos, que se originam na medula óssea, são capazes de migrar para áreas de dano tecidual, onde se instalam e parecem se diferenciar em miofibroblastos e, muito possivelmente, em fibroblastos, contribuindo assim para a rápida reconstrução do estroma. Essa organização garante que grandes números de células possam ser rapidamente mobilizados a partir de fontes fora do local da lesão com o intuito de reconstruir o estroma danificado. Os fortes paralelos entre a cicatrização de lesão e a tumorigênese, descritos aqui, sugerem que o recrutamento do fibrócitos também participa no importante papel de gerar estroma associado ao tumor.

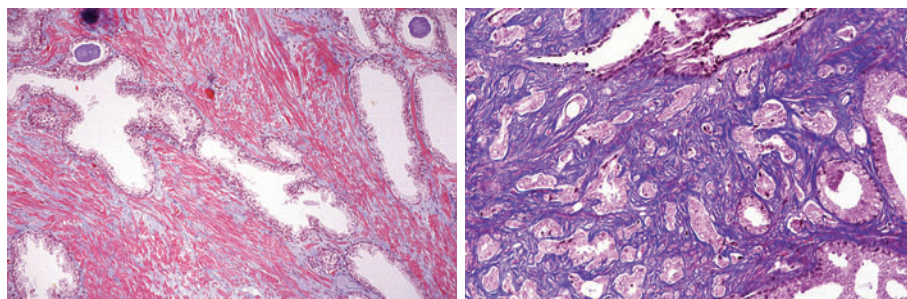
idas progressivamente pela densa ECM **acelular** collagenosa que é a marca desse tipo de estroma associado ao tumor. Os processos que levam à formação de um estroma desmoplástico associado ao tumor parecem ser similares àqueles que operam em sítios de cicatrização da lesão. Entretanto, no tumor, esses processos operam continuamente por muitos meses e anos, em vez de transientemente durante períodos de vários dias, como acontece durante a cicatrização da lesão.

Outra dica de comparação entre cicatrização de lesão e tumorigênese vem dos inúmeros estudos indicando que agentes conhecidos por inibir a angiogênese associada ao tumor também antagonizam a cicatrização da lesão. Incluídos dentre esses antagonistas estão certos inibidores solúveis dos receptores de fatores de crescimento que têm funções-chave na angiogênese, assim como um componente de ECM, chamado trombospodina-1 (Tsp-1), o qual é uma molécula antiangiogênica potente. Esses mecanismos comuns compartilhados pela cicatrização da lesão e por interações estroma-epitélio nos tumores também têm implicações para a prática clínica (Barra lateral 13.4).

O termo “fibroblastos associados a carcinoma” (CAFs) é algumas vezes usado para descrever as populações mistas de fibroblastos e miofibroblastos que estão presentes no estroma de tumores epiteliais. Análises dos padrões de expressão de genes de CAFs enfatizam as fortes similaridades entre essas células e os fibroblastos presentes nos sítios da lesão. Além disso, esses estudos fornecem uma indicação do papel de tais células como atores-chave na progressão do tumor.

Essas análises inicialmente determinaram os padrões de expressão de genes de fibroblastos estimulados por soro propagados *in vitro*, isto é, fibroblastos que estavam sem soro e então foram expostos a altas concentrações de soro fresco. Tal exposição recria o ambiente dos fibroblastos durante os estágios iniciais da cicatrização da lesão (um período quando os vários fatores do soro liberados por plaquetas ativadas agem nos fibroblastos do estroma no sítio da lesão, convertendo-os, pelo menos transientemente, em miofibroblastos). Uma coorte relativamente pequena de genes induzidos e reprimidos do soro foi extraída desses dados e usada para representar a “assinatura” característica dos fibroblastos estimulados por soro (Figura 13.18A).

Figura 13.17 Micrografia do estroma normal e do estroma desmoplástico O estroma histologicamente complexo do tecido normal pode finalmente ser substituído por estroma desmoplástico de um carcinoma avançado. Nesta figura, vemos tecido normal de próstata de humano (*painel à esquerda*) marcado com o corante tricromo de Masson, o qual revela, em rosa, extensivas células da musculatura lisa no estroma; ductos normais estão espalhados ao longo desse estroma. Ao contrário, em carcinomas avançados de próstata (*painel à direita*) marcados identicamente e vistos com a mesma magnitude revelam o extensivo estroma desmoplástico (*roxo-azulado*), o qual é rico em matriz extracelular, mais precisamente, colágeno tipo I. Ilhas de células de carcinoma de próstata que formam pequenos ductos (*rosa*) estão dispersos ao longo desse estroma desmoplástico, o qual não tem significativos números de células viáveis, como miofibroblastos e fibroblastos. (De G. Ayala, J.A. Tuxhorn, T.M. Wheeler et al., *Clin. Cancer Res.* 9:4792-4801, 2003.)



Barra lateral 13.4 A cirurgia de câncer de mama pode levar à estimulação do crescimento tumoral. Estudos epidemiológicos de pacientes com câncer de mama que são submetidas a cirurgia (i. e., mastectomia parcial ou total) para a remoção de tumores primários revelaram um pico de recorrência de cânceres de mama no local inicial, assim como em locais anatomicamente distantes, cerca de três anos após a cirurgia. Os tempos desses relapsos sugerem que a cirurgia é responsável por estimular suas formações. O exame de fluidos drenados dos locais das lesões na mama criadas pela cirurgia demonstrou a presença de potentes fatores mitogênicos, que estão associados ao processo de cicatrização da lesão. Dentre esses, estão mitógenes para células de

câncer de mama, especialmente aquelas células cancerosas que superexpressam a proteína HER2/Neu. Além disso, uma explosão na síntese de fatores de crescimento vascular endotelial (VEGF) ocorre após a cirurgia; como discutido a seguir neste capítulo, VEGF é um potente estimulante de angiogênese tumoral. É, no entanto, plausível que a cirurgia estimule a proliferação de micrometástases residuais (pequenos depósitos de células metastáticas) que não são detectados e removidos pelos cirurgiões quando eles fazem a excisão dos tumores primários. De fato, alguns argumentam que os relapsos clínicos estimulados pela cirurgia anulam muitos dos benefícios terapêuticos que poderiam ser alcançados pela remoção de tumores primários e linfonodos

próximos. A importância da progressão tumoral estimulada por cirurgia permanece um problema de grande alegação.

Outra observação clínica pode finalmente ser encontrada para sustentar essa discussão: quando Herceptina (um anticorpo monoclonal terapêutico que bloqueia a ação do receptor de HER2/Neu; veja a Seção 15.19) é aplicado posteriormente em mulheres que tenham dado origem a tumores de baixo grau relativamente pequenos, a taxa de relapsos clínicos é reduzida por mais de 50%. Esse sucesso terapêutico impressionante pode um dia ser traçado para a habilidade da Herceptina de bloquear o estímulo de células cancerosas residuais pelos fatores de crescimento elaborados durante o período de cicatrização do local da lesão cirúrgica.

Os padrões de expressão de RNA de um grande grupo de carcinomas humanos foi então analisado. Em cada caso, tais análises determinaram se um tumor expressou a assinatura dos fibroblastos estimulados do soro. (Já que todos os genes sendo analisados estão associados especificamente a fibroblastos, essas análises, por necessidade, refletiram os padrões de expressão de RNA dos CAFs em cada tumor.) Ainda, foi observado que muitos carcinomas expressam a assinatura de fibroblastos estimulados pelo soro. Significativamente, os carcinomas que expressaram essa assinatura mais intensivamente foram associados a um prognóstico clínico mais cruel (Figura 13.18B e C). Tal correlação sugere que o estroma rico em miofibroblasto ativado representa uma força que pode dirigir a progressão tumoral agressiva.

13.4 Células do estroma são contribuintes ativos da tumorigênese

Vários experimentos biológicos fornecem demonstrações ainda mais diretas da profunda influência que células recrutadas do estroma exercem sobre a tumorigênese de células epiteliais. Em um estudo, queratinócitos imortalizados, previamente não-tumorigênicos, foram forçados a secretar PDGF em altos níveis (alcançados pela introdução de um vetor de expressão de PDGF). O fator de crescimento liberado não teve efeito na proliferação dessas células epiteliais *in vitro*, pois elas não exibem receptores PDGF na sua superfície. Entretanto, quando foram implantadas em camundongos hospedeiros, elas adquiriram a habilidade de formar tumores de crescimento robusto, claramente derivados da habilidade de PDGF liberado em recrutar e ativar células do estroma. As células do estroma então retribuíram pelo direcionamento da proliferação de queratinócitos secretores de PDGF, finalmente fazendo com que este último sofresse de transformação maligna.

Em um experimento complementar, modificações da linhagem germinativa de camundongo, alterada geneticamente, permitiram aos investigadores inativar seletivamente os receptores de TGF- β tipo II nos fibroblastos do estroma em uma variedade de tecidos. Como consequência, essas células do estroma não eram mais suscetíveis à inibição do crescimento mediado por TGF- β , e hiperplasia de estroma ocorreu em muitos desses tecidos. Em alguns destes, os fibroblastos hiperproliferativos guiaram as camadas celulares epiteliais das redondezas a se proliferarem e finalmente, desenvolverem carcinomas (Figura 13.19). Isso demonstra, mais uma vez, o poder das células estromais em estimular a proliferação de células epiteliais, fazendo-o de forma que pode levar à transformação neoplásica das células epiteliais.

O importante papel de fibroblastos do estroma no suporte do crescimento dos tumores pode ser demonstrado por outro tipo de experimento: células epiteliais mamárias de humano, transformadas, fracamente tumorogênicas (MECs) requerem mais de dois meses para formar um tumor após serem introduzidas em camundongos hospedeiros imunocomprometidos (Figura 13.20). Entretanto, quando essas células cancerosas foram misturadas com fibroblas-

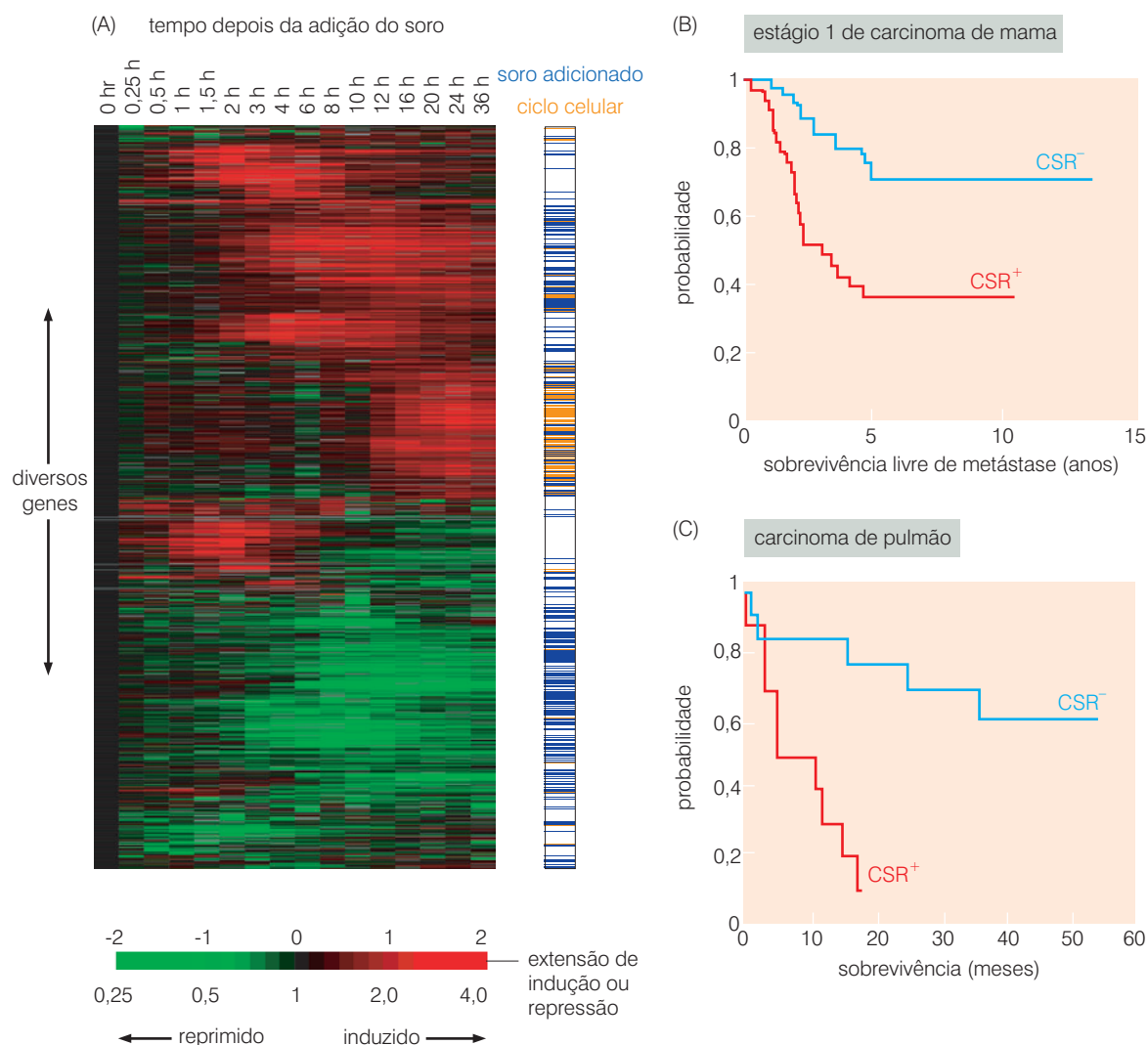
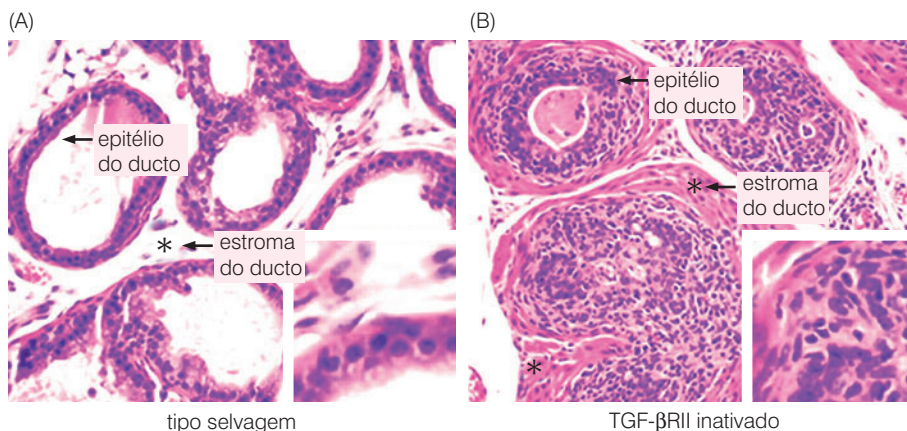


Figura 13.18 Arranjos de expressão gênica de miofibroblastos associados a tumor e fibroblastos ativados pelo soro A análise do espectro de genes expressados em uma população de células ou em um tecido é frequentemente chamada de *genômica funcional*. (A) Nesta análise da expressão gênica, a expressão dos mRNAs celulares foi analisada após a adição de soro fresco em fibroblastos humanos previamente quiescentes privados de soro; isso causou a entrada dessas células no ciclo celular ativo e a indução ou repressão da expressão de uma grande coorte de genes. A expressão gênica foi medida em vários tempos (*acima*) após a adição do soro. A coorte de genes analisados (*não-nomeados*) está ordenada verticalmente do *topo para baixo*. Genes que foram induzidos ou reprimidos tardiamente após a adição do soro foram classificados como “genes do ciclo celular” (*linhas laranjas, barra vertical da direita*), enquanto os genes que foram induzidos ou reprimidos no início e não sofreram alteração com a fase do ciclo celular foram classificados como genes “de resposta ao soro adicionado” (CSR) (*linhas azuis, barra vertical à direita*). A barra horizontal (*abaixo*) é uma chave que indica o grau de indução (*vermelho*) ou repressão (*verde*) após a adição de soro, o que é

indicado logaritmicamente acima da barra e em números absolutos abaixo da barra. (Genes que são induzidos mais do que quatro vezes acima, ou reprimidos mais do que quatro vezes abaixo desses níveis são simplesmente registrados aqui como sendo induzidos ou reprimidos quatro vezes.) (B) A expressão-padrão dos genes CSR foi analisada em uma série de tumores em mulheres apresentando câncer de mama com estágio 1 (i. e., estágio inicial). Conforme indicado aqui, aqueles tumores expressando padrão de genes CSR (*linha vermelha*) demonstraram uma probabilidade muito maior para desenvolver metástases ao longo dos anos depois do tratamento inicial quando comparados com aqueles cujos tumores não mostraram esse padrão de expressão gênica (*azul*). (C) Similarmente, aqueles pacientes cujos adenocarcinomas de pulmão (incluindo todos os estágios de progressão tumoral no tempo do diagnóstico) apresentaram uma assinatura de expressão do gene CSR (*linha vermelha*) sofreram índices de mortalidade dramaticamente maiores comparados com aqueles cujos tumores não apresentaram essa assinatura da expressão do gene (*linha azul*). (De H.Y. Chang, J.B. Sneddon, A.A. Alizadeh et al., *PLoS Biol.* 2: E7, 2004.)

Figura 13.19 Tumores de próstata de camundongos com fibroblastos do estroma geneticamente alterados. O gene que codifica o receptor TGF- β tipo II foi inativado seletivamente em fibroblastos presentes em uma variedade de tecidos epiteliais do camundongo. (A) As próstatas de camundongos machos normalmente exibem uma fina camada de células epiteliais delimitando o lúmen do ducto e uma camada relativamente fina de células estromais (asterisco) fora das camadas de células epiteliais. (B) Como consequência da inativação do receptor TGF- β tipo II em fibroblastos do estroma, ambas as camadas celulares se tornam hiperplásicas. As células epiteliais em seguida criaram tecidos parecidos à neoplasia intra-epitelial prostática (PIN) comumente vista em humanos (veja a Figura 13.40). Isso sugere que o estroma hiperplásico liberou sinais de proliferação para o epitélio nas proximidades. De fato, a produção de fator de crescimento de hepatócitos (HGF) – um mitógeno potente da célula epitelial – pelas células do estroma, aumentou três vezes após perderem sua capacidade de resposta aos efeitos inibitórios de TGF- β . No estômago desses camundongos, no qual os receptores TGF- β tipo II foram inativados no estroma gástrico, o epitélio hiperplásico que foi formado tornou-se displásico e em seguida progrediu para formar carcinomas. Nas figuras menores, observa-se maiores magnitudes. (De N.A. Bhowmick, A. Chytil, D. Plieth et al., *Science* 303:848-851, 2004.)

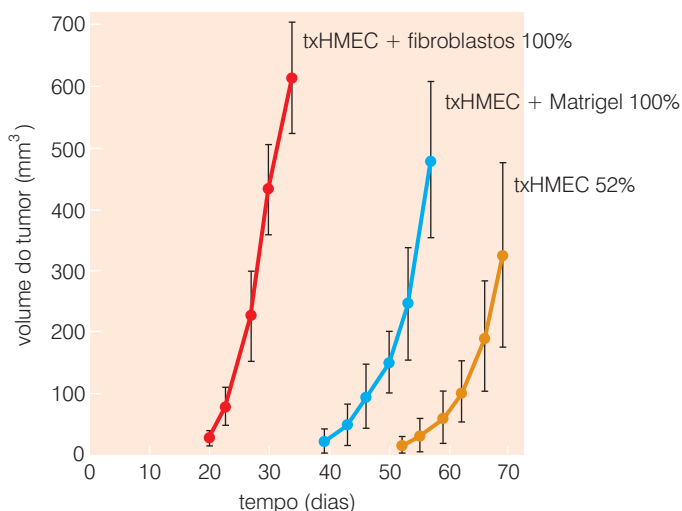


tos do estroma mamário de humanos (a partir de tecido normal de mama) antes da injeção nos hospedeiros, as células formaram tumores em um terço do período. Esse emaranhado de fibroblastos claramente evitou a necessidade dessas MECs de perder tempo recrutando fibroblastos do camundongo hospedeiro – um processo que geralmente requer muitas semanas; na ausência de tais fibroblastos, o crescimento do tumor não poderia iniciar.

Esse experimento abordou um assunto relacionado, especificamente, se as células estromais de tecidos epiteliais normais podem acelerar a formação do tumor tão efetivamente como as células do estroma presentes nos carcinomas. Esse assunto foi abordado comparando as ações de fibroblastos do estroma extraídos a partir de um tecido epitelial normal com os fibroblastos associados ao carcinoma (CAFs) preparados a partir de carcinomas (nos quais miofibroblastos são abundantes; veja a Figura 13.16). Em um grupo de experimentos, fibroblastos foram purificados a partir do estroma de glândulas normais de próstata de humano, enquanto as CAFs foram preparadas a partir do estroma de carcinomas de próstata de humano. Cada uma dessas populações celulares foi então misturada com células epiteliais da próstata de humano imortalizadas pelo antígeno SV40 large T, não-tumorigênicas, e então implantadas em camundongos Nude imunocomprometidos. Os resultados, resumidos na Figura 13.21, mostraram diferenças dramáticas no crescimento desses enxertos de tecidos mesclados. Em particular, os enxertos contendo CAFs mais células epiteliais da próstata imortalizadas formaram tumores que foram 500 vezes maiores do que aqueles que continham fibroblastos normais da próstata mais células epiteliais imortalizadas da próstata. (Quando injetadas sozinhas, as CAFs não formaram tumores de maneira alguma.)

Tais experimentos demonstraram que essas CAFs foram funcionalmente muito diferentes dos fibroblastos do estroma presentes em tecidos prostáticos normais. Diferentemente determinado,

Figura 13.20 Fibroblastos misturados e crescimento tumoral. Quando células epiteliais mamárias de humanos (HMECs) foram transformadas por meio da introdução da região inicial de SV40, o gene *hTERT*, e de um oncogene de *ras* fracamente expresso (Seção 11.12), as HMECs (txHMECs) transformadas resultantes formavam tumores, embora com um longo período de intervalo após a injeção, em apenas cerca da metade dos camundongos que foram injetados (*curva laranja*). Esse desenvolvimento lento foi acelerado um pouco e a eficiência da formação do tumor foi dobrada quando uma preparação de matriz extracelular (Matrigel) produzida por fibroblastos foi misturada com essas células antes da introdução nos camundongos hospedeiros (*curva azul*). Entretanto, quando fibroblastos do estroma mamário de uma mama humana normal foram misturados aos MECs humanos transformados antes da injeção, as células cancerosas rapidamente formaram tumores com 100% de eficiência (*curva vermelha*). Isso ilustra que o recrutamento de fibroblastos do estroma é uma etapa limitante na velocidade de formação do tumor. (De B. Elenbaas, L. Spirio, F. Koerner et al., *Genes Dev.* 15:50-65, 2001.)



durante o curso da progressão do tumor, células do estroma se tornaram altamente especializadas em auxiliar seus vizinhos epiteliais para sobreviver e proliferar. Observações similares têm, desde então, sido feitas com CAFs extraídas a partir de cânceres de mama de humano.

Ainda, esses experimentos não revelaram precisamente *como* as populações de CAF ricas em miofibroblastos aceleram o crescimento tumoral. Uma vez estabelecidos dentro do estroma associado ao tumor, os miofibroblastos provavelmente conferem benefícios múltiplos para as células cancerosas epiteliais das redondezas. Possivelmente o mais importante desses benefícios seja a angiogênese. Miofibroblastos ajudam a tumorogênese por meio de sua habilidade de liberar fator 1 derivado de estroma (SDF-1), também chamado de CXCL12; este fator (uma quimiocina) serve para recrutar células precursoras endoteliais circulantes (EPCs) para dentro do estroma do tumor (Figura 13.22). O VEGF secretado por miofibroblastos ajuda a induzir esses recrutados para se diferenciarem em células endoteliais que formam a **nova vasculatura** do tumor. Como a angiogênese é geralmente uma etapa limitante na velocidade de formação do tumor, os efeitos de estimulação do tumor de CAFs misturadas podem ser amplamente devidos à sua habilidade de acelerar a angiogênese tumoral.

Em alguns tumores, o estroma alterado funcionalmente pode ser traçado para um mecanismo bastante diferente daquele descrito anteriormente: células do estroma em carcinomas avançados, que coexistiram com células cancerosas epiteliais por muitos anos, podem alterar seu genótipo e adquirir características que células geneticamente normais do estroma não podem alcançar. Isso sugere que células do estroma se co-envolvem com seus vizinhos neoplásicos durante esses longos períodos de desenvolvimento tumoral alterando seus genomas com o objetivo de se adaptarem ao estresse fisiológico presente nos tumores.

Por exemplo, análises de um grande grupo de cânceres de mama humano com mutações nos genes supressores de tumor *PTEN* e *TP53* mostraram a presença de alelos somaticamente mutados desses genes em células de estroma isoladas a partir de tumores. Tais experimentos exploraram o procedimento de microdissecação por captura a *laser* (LCM; Figura 13.23) para isolar pequenos retalhos de células de estroma ou epiteliais a partir desses tumores. Em alguns tumores, alelos *TP53* mutantes distintos foram encontrados nos compartimentos epiteliais e estromais. Em outros, alelos mutantes foram encontrados em uma população de células, mas não em outra. Tais experimentos abriram portas para a possibilidade de que a evolução genética bem-documentada de células epiteliais neoplásicas (Capítulo 11) seja frequentemente acompanhada por trocas nos genomas de células de estroma das redondezas.

13.5 Os macrófagos representam participantes importantes na ativação do estroma associado ao tumor

O recrutamento ativo de macrófagos dentro de massas tumorais pareceria, em um primeiro instante, ser contraproduutivo para a formação tumoral, uma vez que macrófagos são geralmente desenvolvidos pelo sistema imune para limpar e destruir agentes infecciosos e células anormais, conforme exploraremos em mais detalhes no Capítulo 15. Entretanto, evidências cada vez maiores indicam que essas células imunes também têm papéis importantes na *promoção* do desenvolvimento tumoral.

Em mais detalhes, monócitos a partir de uma linhagem mielóide na medula óssea entram na circulação geral, da qual são recrutados por células cancerosas para dentro do tumor; uma vez estabelecidos no tumor, os monócitos são induzidos a diferenciarem-se em macrófagos (veja a Figura 13.14). Esse recrutamento depende dos sinais de atração que são convergidos por fatores **quimiotáticos**. Por definição, tais fatores fornecem pistas direcionais para células móveis em vez de estimulação mitogênica. No caso de **leucócitos** (células brancas do sangue como os monócitos), os fatores quimiotáticos relevantes são frequentemente chamados de **quimiocinas**, isto é, citocinas quimiotáticas.

A quimiocina conhecida como proteína 1 quimiotática de monócito (algumas vezes chamada de proteína quimioatraente de macrófagos; MCP-1) é expressada em quantidades signifi-

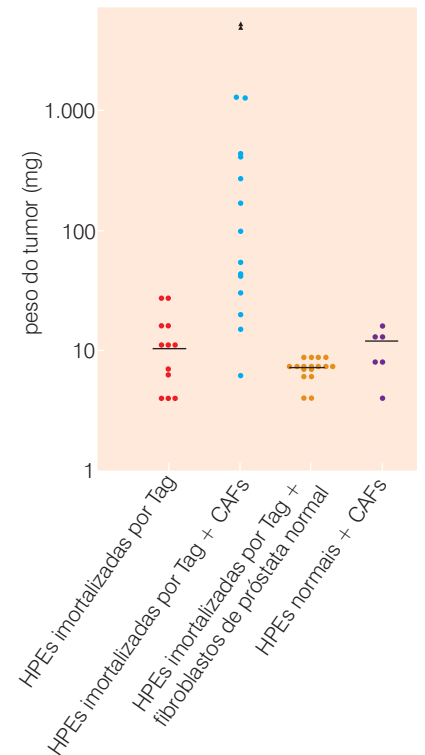
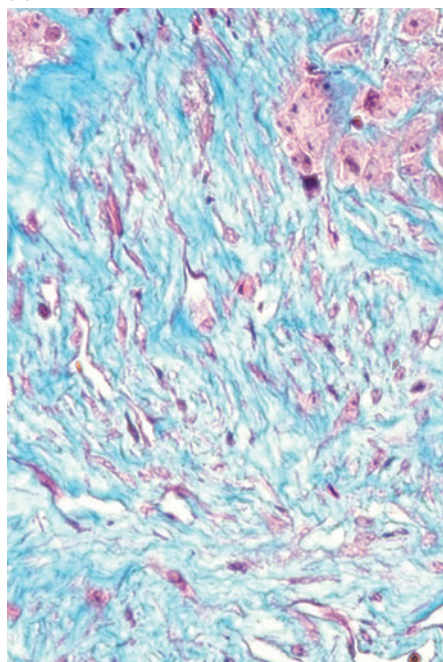


Figura 13.21 Efeito das células estromais prostáticas nas células epiteliais prostáticas imortalizadas Quando células epiteliais normais de próstata humana (HPEs) que foram imortalizadas por antígenos T SV40 (HPEs imortalizadas por Tag) foram introduzidas em camundongos Nude, elas formaram crescimentos de ~ 10 mg após várias semanas, significativamente não muito maiores do que o inóculo inicial (*pontos vermelhos*). Entretanto, se essas mesmas células foram misturadas com fibroblastos associados a carcinomas (CAFs) preparados a partir de um carcinoma de próstata humana, surgiram tumores, e o peso médio desses tumores foi 10 vezes maior (HPEs imortalizados por Tag + CAFs), (*pontos azuis*). Em contraste, quando essas células epiteliais imortalizadas pelo antígeno T foram misturadas com fibroblastos do estroma a partir de uma próstata humana normal, o peso médio dos crescimentos resultantes foi de ~7 mg, possivelmente até menor do que o inóculo inicial (*pontos cor de laranja*). E, se CAFs foram misturadas com células epiteliais normais da próstata humana antes da inoculação, o peso médio após várias semanas foi, mais uma vez, somente ~10 mg (*pontos roxos*). (De A.F. Olumi, G.D. Grossfeld, S.W. Hayward et al., *Cancer Res.* 59:5002-5011, 1999.)

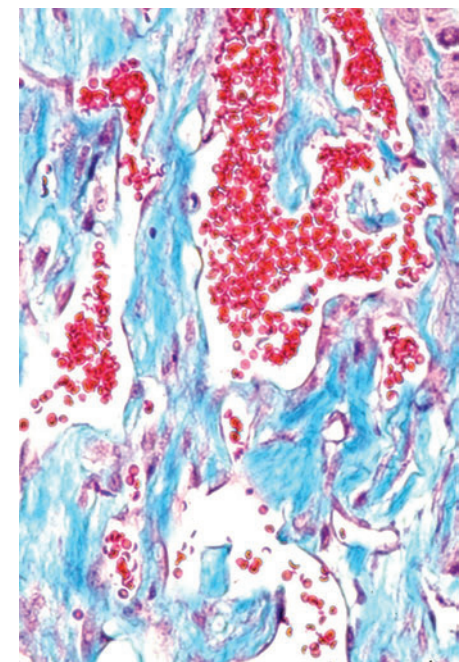
Figura 13.22 Recrutamento de células precursoras endoteliais por CAFs mamárias

(A) Tumores foram montados pela mistura de fibroblastos de estroma com células da linhagem celular de câncer de mama humano MCF7-ras. Quando fibroblastos normais de estroma mamário humano são misturados a células cancerosas de mama (*painel da esquerda*), os tumores resultantes apresentaram números relativamente menores de vasos sanguíneos (*vermelho*) entre o estroma associado a tumor (*azul*). Entretanto, a mistura de fibroblastos associados a carcinoma (CAFs; *painel da direita*) resulta em tumores altamente vascularizados com grandes vasos e eritrócitos associados (*vermelho*). O acesso resultante à circulação provavelmente facilita muito o crescimento do tumor. (B) A habilidade das CAFs, as quais são essencialmente miofibroblastos, em atrair células endoteliais poderia ser demonstrada por um experimento *in vitro*, no qual células da medula óssea marcadas com proteínas fluorescentes verdes (GFP) que expressam antígenos de superfície característicos de células endoteliais precursoras (EPCs) foi colocada acima de uma membrana permeável em uma câmara de Boyden. Tanto fibroblastos normais de estroma mamário como CAFs de um câncer de mama foram colocados na superfície da câmara inferior. Após 18 horas, o número de EPCs que foram recrutados para a base da câmara inferior foi medido por microscopia de fluorescência. (C) Análises das células anexadas à câmara inferior indicaram que as CAFs (*painel da direita*) são capazes de atrair muito mais EPCs marcadas por GFP do que os fibroblastos normais de estroma mamário (*painel da esquerda*). Esse recrutamento poderia ser reduzido em 60% pela adição de anti-soro que neutraliza a quimiocina SDF-1/CXCL12 liberada por CAFs nessas câmaras, indicando sua função importante na mediação deste recrutamento. (De A. Orimo, P.B. Gupta, D.C. Sgroi et al., *Cell* 121:1-14, 2005.)

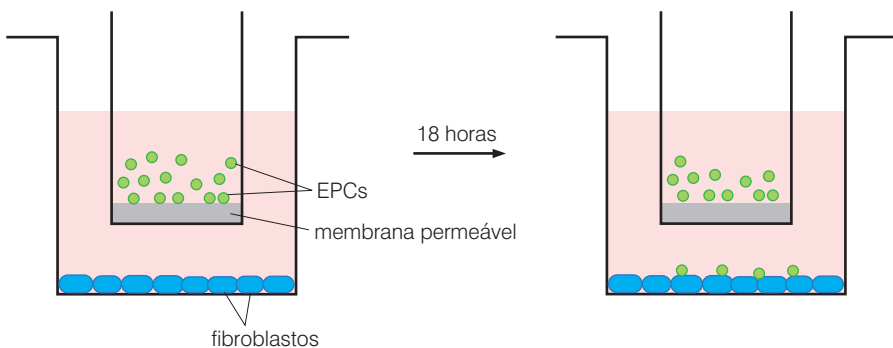
(A) fibroblastos mamários normais misturados



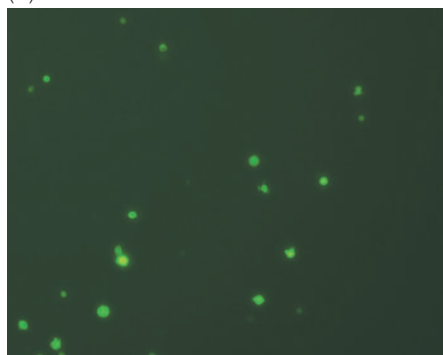
fibroblastos associados a carcinoma misturados



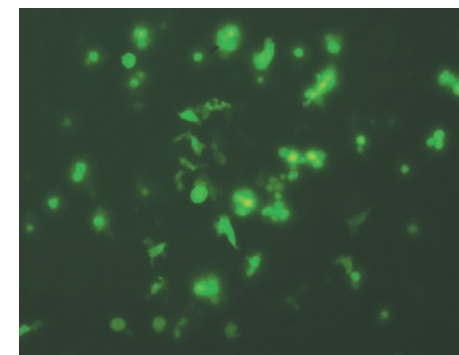
(B)



(C)



fibroblastos mamários normais



fibroblastos associados a carcinoma

cativas por um amplo espectro de tipos celulares de câncer neuroectodermal e epitelial. Isso parece ser um sinal crítico para atração de monócitos para alguns tumores e indução da sua diferenciação em macrófagos. Em outros tumores, o fator de crescimento de endotélio vascular (VEGF), o fator 1 estimulador de colônias (CSF-1; frequentemente chamado M-CSF; fator estimulador de colônias de macrófagos) e o PDGF liberado pelas células tumorais também parecem auxiliar nesse recrutamento, enquanto CSF-1 ajuda na estimulação da diferenciação de monócitos para macrófagos (Figura 13.24).

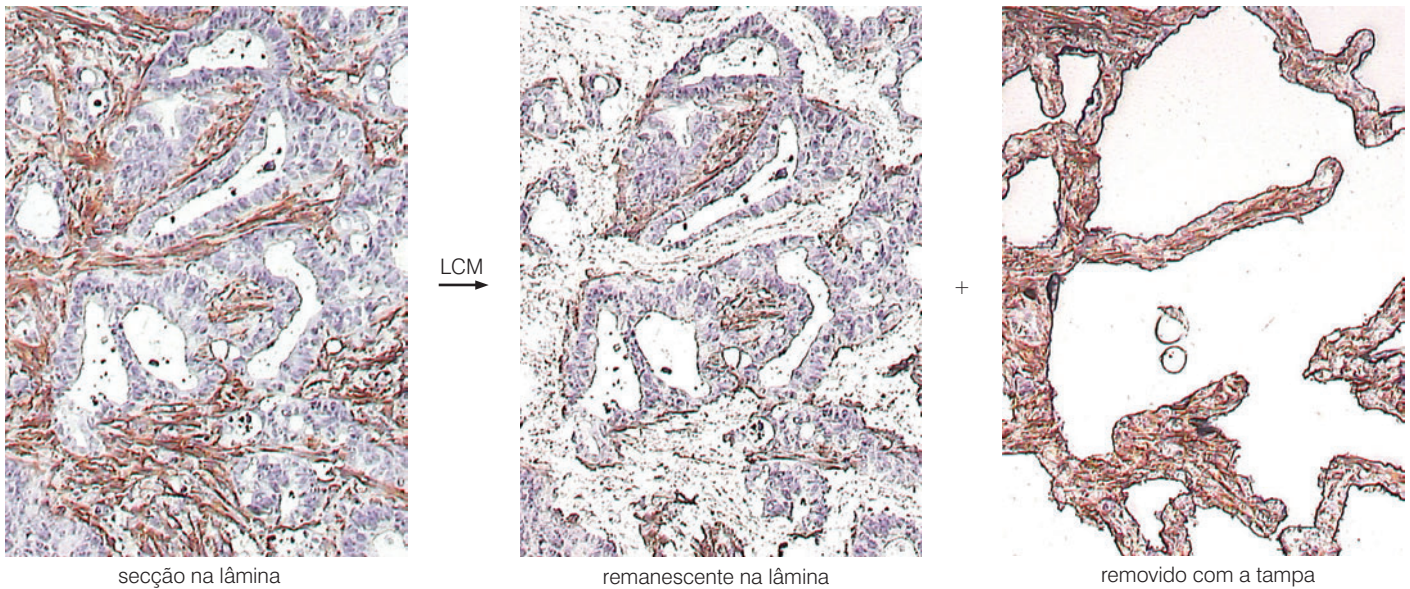


Figura 13.23 Microdissecação de captura a laser O procedimento de microdissecação de captura a laser (LCM) permite a um investigador usar um feixe de laser para microdissecar seções de tecidos que foram fixadas em uma lâmina de microscópio. Como parte do procedimento de LCM, um material transparente, chamado de "tampa", é colocado sobre uma lâmina de microscópio na qual uma seção de tecido foi fixada. Um feixe de laser guiado por um motor então irradia áreas selecionadas, que se aderem à tampa; a tampa pode ser depois erguida com células aderentes, as quais então podem ser analisadas

bioquimicamente. Como visto nesta figura, a seção de um carcinoma de cólon humano mostrada no *painel da esquerda* contém tanto regiões epiteliais (*azul-claro*) como regiões do estroma (*marrom*). Nessa circunstância, o procedimento LCM fez com que as áreas epiteliais fossem deixadas para trás na lâmina (*painel central*), enquanto as regiões do estroma são colocadas para cima (*painel da direita*). Ambos os grupos de células puderam então ser estudados por vários procedimentos analíticos, incluindo os arranjos de expressão gênica. (Cortesia de H. Dolznig.)

Uma vez estabelecidos no estroma do tumor, macrófagos têm funções importantes na estimulação da angiogênese. Além disso, em alguns cânceres, como nos carcinomas de mama, existe uma correlação direta entre o nível de MCP-1 produzido, o número de macrófagos presentes e o nível de angiogênese induzido pelos vários tumores; em outros tumores, a densidade de infiltração dos macrófagos associados ao tumor está correlacionada com a densidade de microvasos (veja, p. ex., a Figura 13.25A, B e C; essa densidade pode ser medida pela contagem do número de capilares por campo microscópico em uma seção do tumor). Uma função principal dos macrófagos no direcionamento da progressão tumoral é sugerida por inúmeros relatórios, demonstrando uma correlação direta entre a presença de uma alta densidade de macrófagos nas massas tumorais e um prognóstico pobre para pacientes com câncer que carregam tais tumores. Agora, essa correlação foi documentada em gliomas e em carcinomas da mama, ovário, próstata, cérvix, bexiga e pulmão.

Tal evidência, entretanto, é somente *correlativa*. Evidências mais convincentes da função *causal* dos macrófagos, pelo menos na angiogênese tumoral, são embasadas por experimentos nos quais células cancerosas são forçadas experimentalmente a expressar níveis mais altos de MCP-1. A expressão desta quimiocina permite que as células cancerosas atraiam mais macró-

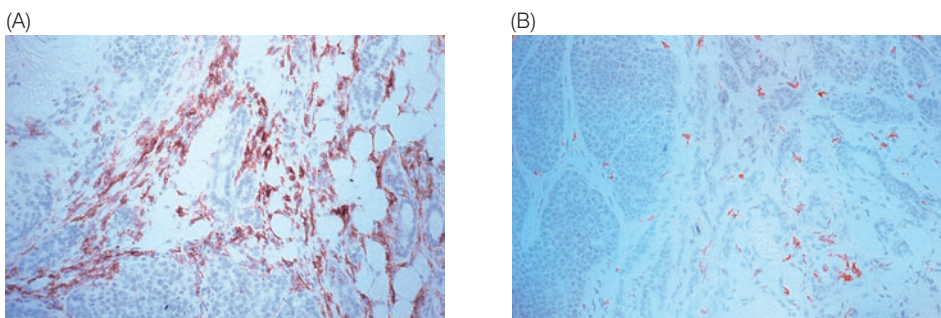


Figura 13.24 Recrutamento de macrófagos por CSF-1 Em alguns tumores, o fator estimulador de colônia 1 (CSF-1) liberado por células tumorais serve como o atrai-chave para monócitos e macrófagos. Nos camundongos transgênicos estudados aqui, a tumorigênese mamária foi guiada por um transgene, o qual foi construído a partir de um promotor transcricional de MMTV (vírus tumoral mamário de camundongo) que guia a expressão do oncogene *middle T* de polioma (PyMT). (A) Este tumor surgiu em um camundongo transgênico PyMT que era heterozigoto no loco *Csf1*, uma vez que carregava um alelo nulo do gene que codifica para CSF-1, chamado *Csf1^{op}*. A presença de macrófagos no estroma de um tumor é revelada por um anticorpo monoclonal que detecta macrófagos (*marrom-avermelhado*). (B) Este tumor surgiu em um camundongo transgênico que era geneticamente *Csf1^{op/op}* e, portanto, não tinha toda a atividade CSF-1. Conseqüentemente, as células tumorais nos camundongos também foram incapazes de liberar esses quimioatraentes. Neste tumor mamário, os macrófagos são sutilmente detectáveis. A falta de macrófagos não afeta o crescimento do tumor primário, mas suprime fortemente a progressão para um estado metastático. (De E.Y. Lin, A.V. Nguyen, R.G. Russel et al., *J. Exp. Med.* 193:727-740, 2001.)

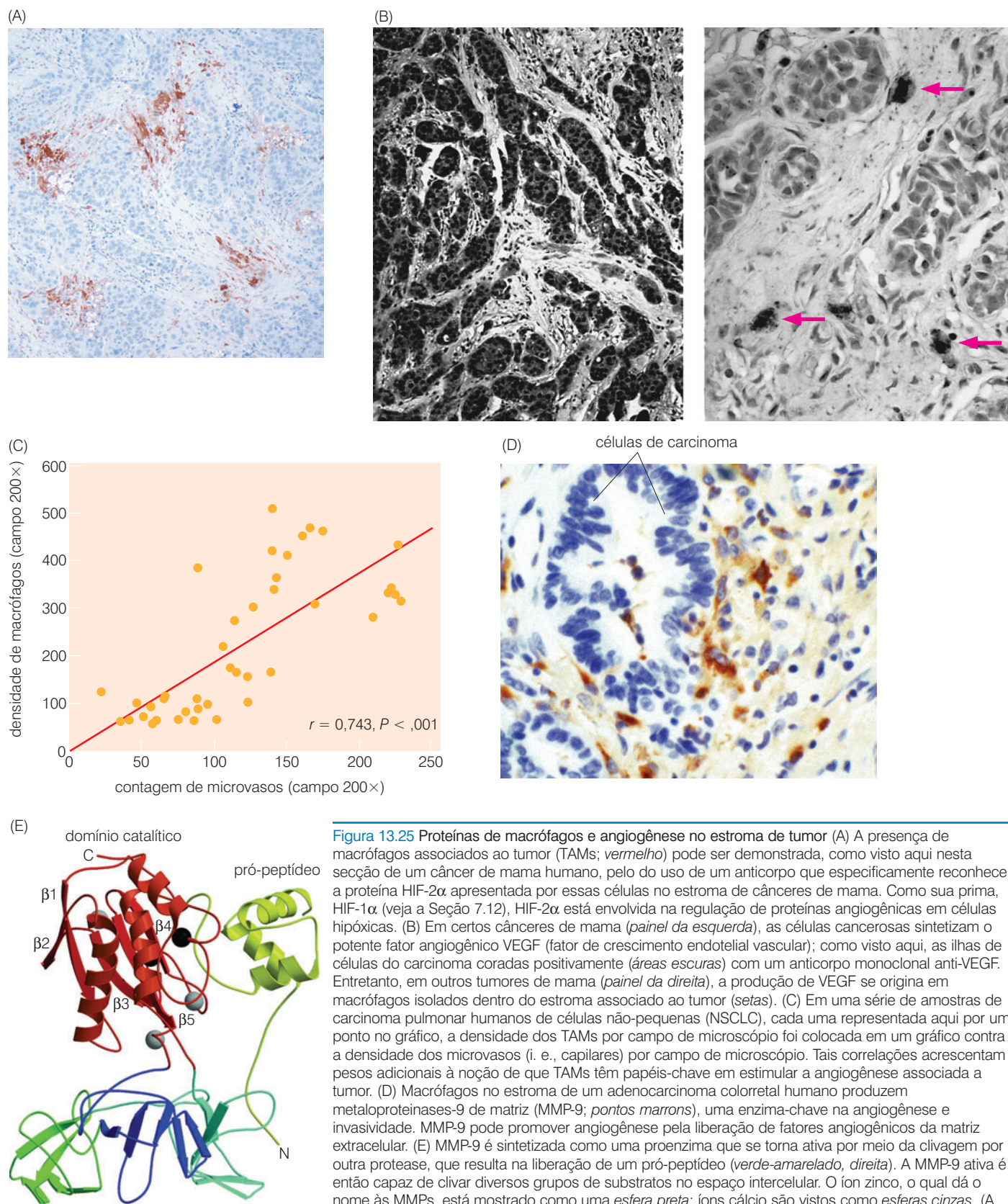


Figura 13.25 Proteínas de macrófagos e angiogênese no estroma de tumor (A) A presença de macrófagos associados ao tumor (TAMs; *vermelho*) pode ser demonstrada, como visto aqui nesta secção de um câncer de mama humano, pelo do uso de um anticorpo que especificamente reconhece a proteína HIF-2 α apresentada por essas células no estroma de cânceres de mama. Como sua prima, HIF-1 α (veja a Seção 7.12), HIF-2 α está envolvida na regulação de proteínas angiogênicas em células hipóxicas. (B) Em certos cânceres de mama (*painel da esquerda*), as células cancerosas sintetizam o potente fator angiogênico VEGF (fator de crescimento endotelial vascular); como visto aqui, as ilhas de células do carcinoma coradas positivamente (*áreas escuras*) com um anticorpo monoclonal anti-VEGF. Entretanto, em outros tumores de mama (*painel da direita*), a produção de VEGF se origina em macrófagos isolados dentro do estroma associado ao tumor (*setas*). (C) Em uma série de amostras de carcinoma pulmonar humanos de células não-pequenas (NSCLC), cada uma representada aqui por um ponto no gráfico, a densidade dos TAMs por campo de microscópio foi colocada em um gráfico contra a densidade dos microvasos (i. e., capilares) por campo de microscópio. Tais correlações acrescentam pesos adicionais à noção de que TAMs têm papéis-chave em estimular a angiogênese associada a tumor. (D) Macrófagos no estroma de um adenocarcinoma colorretal humano produzem metaloproteinases-9 de matriz (MMP-9; *pontos marrons*), uma enzima-chave na angiogênese e invasividade. MMP-9 pode promover angiogênese pela liberação de fatores angiogênicos da matriz extracelular. (E) MMP-9 é sintetizada como uma proenzima que se torna ativa por meio da clivagem por outra protease, que resulta na liberação de um pró-peptídeo (*verde-amarelado, direita*). A MMP-9 ativa é então capaz de clivar diversos grupos de substratos no espaço intercelular. O íon zinco, o qual dá o nome às MMPs, está mostrado como uma *esfera preta*; íons cálcio são vistos como *esferas cinzas*. (A, de R.D. Leek and A.L. Harris, *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 7:177-189, 2002; B, de R.D. Leek, N.C. Hunt et al., *J. Pathol.* 190:430-436, 2000; C, de J.J.W. Chen, Y.C. Lin, P.L. Yao et al., *J. Clin. Oncol.* 22:953-964, 2005; D, de B.S. Nielsen, S. Timshel, L. Kjeldsen et al., *Int. J. Cancer* 65:57-62, 1996; E, de P.A. Elkins, Y.S. Ho, W.W. Smith et al., *Acta Crystal. Series D* 58:1182-1192, 2002.)

fagos, os quais procedem para secretar importantes fatores angiogênicos, especialmente VEGF e interleucina-8 (IL-8), resultando em aumentos marcados na atividade angiogênica e na formação de uma vasculatura mais extensiva associada ao tumor. Além disso, quando células cancerosas de pulmão são expostas *in vitro* a fatores que foram secretados por macrófagos em cultura, as células cancerosas respondem produzindo IL-8 e várias outras proteínas que promovem a angiogênese e a invasividade celular.

Áreas hipóxicas dentro dos tumores atraem macrófagos, os quais parecem tolerar muito bem a hipóxia. Uma vez estabelecidas em regiões de hipóxia em tumores, essas células inflamatórias começam a secretar quantidades significativas de VEGF (veja a Figura 13.25B e a Seção 7.12), o qual reduz a hipóxia trazendo células endoteliais, capilares e, assim, sangue rico em oxigênio. O fato de que áreas hipóxicas de tumores freqüentemente permanecerem pouco vascularizadas indica que os macrófagos recrutados, por si só, são incapazes de curar totalmente os defeitos locais na angiogênese. Assim, em tumores de crescimento rápido, os macrófagos e a vascularização que eles induzem não podem manter o passo com a velocidade de expansão do tumor, e grandes áreas dentro de uma massa tumoral finalmente se tornam *necróticas* (i. e., preenchidas com células danificadas e mortas) como consequência.

Como os miofibroblastos (Seção 13.3), os macrófagos são adeptos a secretar metaloproteinases de matriz (MMPs; veja a Tabela 13.1). MMP-9, proeminentemente envolvida na progressão do câncer, é produzida por macrófagos associados a tumor (TAMs; Figura 13.25D) e, uma vez ativadas, procedem a clivar vários substratos protéicos importantes no espaço extracelular. Em alguns carcinomas invasivos, incluindo aqueles de mama, bexiga e ovário, TAMs provaram ser a principal fonte dessa enzima. Elas contribuem para a progressão tumoral realçando a angiogênese, rompendo a estrutura tecidual existente e, assim, criando espaços para expandir as massas tumorais e liberando mitógenos críticos que foram imobilizados por meio da ligação a proteoglicanos da

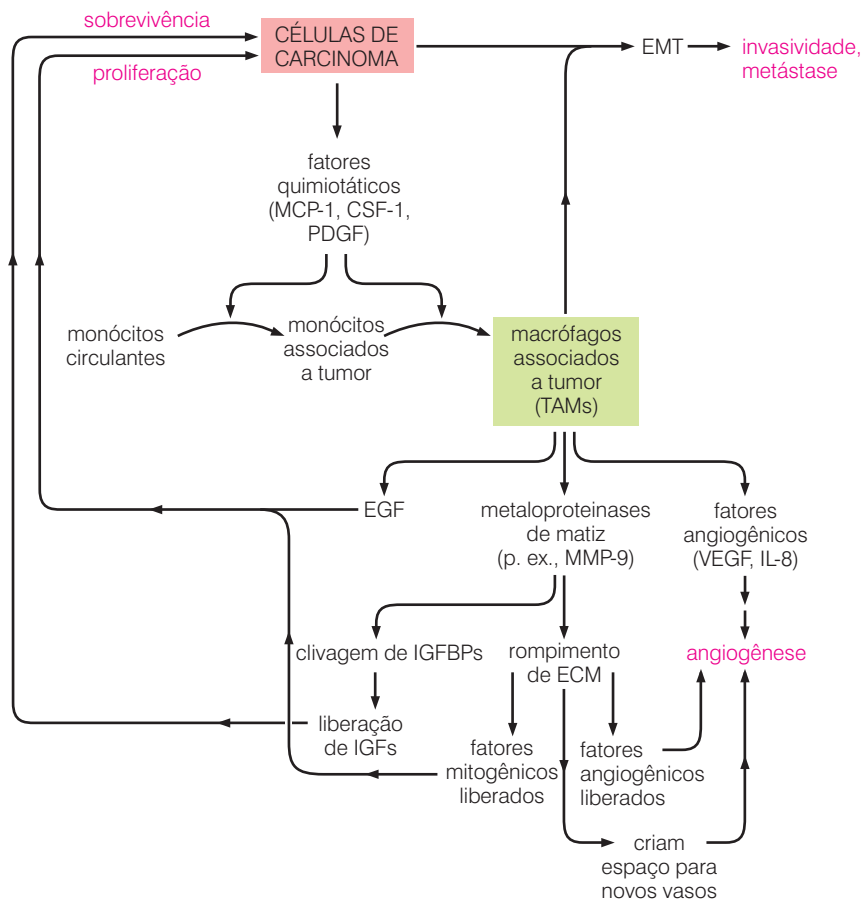


Figura 13.26 Contribuição de macrófagos para a tumorigênese. Macrófagos têm uma função majoritária na liberação de fatores mitogênicos para células de carcinoma bem como na reorganização do estroma tumoral com o objetivo de facilitar a angiogênese e, em alguns tumores, a invasividade de células de carcinoma.

ECM. MMP-9 pode também clivar IGFBPs (proteína de ligação ao fator de crescimento semelhante à insulina; Barra lateral 9.7), que normalmente sequestra moléculas de IGF no espaço extracelular. Isso libera as IGFs, especialmente IGF-1, que então fornece sinais de sobrevivência para as células vizinhas, incluindo células cancerosas (Figura 13.26). Em cânceres de mama avançados, macrófagos associados a tumores são também capazes de ajudar células de carcinoma diretamente, já que eles são a principal fonte de fatores de crescimento epidermal (EGF) que guiam a proliferação de células de carcinoma expressando EGF-R.

Enquanto há evidência abundante implicando alguns macrófagos como colaboradores ativos na progressão do tumor, também está claro que um outro subgrupo morfológicamente distinto de macrófagos, agindo como representantes do sistema imune, pode detectar e matar células cancerosas. Apesar disso, eles claramente falham ao fazer isso em muitos tipos de tumores. Pode ser que algumas células cancerosas adquiram a habilidade de inativar ou cegar as ações **tumorílicas** (matando câncer) dessa segunda classe de macrófagos, enquanto deixam intactas as funções do primeiro tipo que estão envolvidas em ajudar a progressão tumoral. Alternativamente, células cancerosas podem se engajar em manobras evasivas que rendem invisibilidade aos macrófagos que foram despachados pelo sistema imune para destruí-las. Retornaremos à função dos macrófagos e de outros tipos de células imunes no bloqueio do desenvolvimento de tumor no Capítulo 15.

13.6 As células endoteliais e os vasos que elas formam asseguram o acesso adequado dos tumores à circulação

O mais óbvio suporte de estroma requerido pelos tumores já foi citado repetidamente neste capítulo: como os tecidos normais, os tumores requerem acesso à circulação com o objetivo de crescer e sobreviver. Em meados de 1950, patologistas notaram que células cancerosas cresciam preferencialmente ao redor de vasos sanguíneos. Foi observado que aquelas células tumorais que foram localizadas a mais de 0,2 mm de distância dos vasos sanguíneos não cresciam, enquanto outras até mesmo mais distantes morriam (Figura 13.27A).

Agora percebemos que esse espaço de cerca de 0,2 mm representa a distância que o oxigênio pode efetivamente se difundir através de tecidos vivos. Células localizadas dentro desse raio a partir de um vaso sanguíneo podem contar com a difusão para lhes garantir o oxigênio; aquelas situadas além disso sofrem de hipoxia moderada ou grave (Figura 13.27B e C). Tecidos que sofrem de hipoxia estão em perigo de tornarem-se necróticos, como discutido anteriormente e ilustrado nas Figuras 13.27 e 13.28. A morte apoptótica acionada por p53 também ameaça células hipóxicas (Capítulo 9), e a inativação do sistema de sinalização de p53 frequentemente permite que células cancerosas sobrevivam além do pequeno perímetro que circunda cada capilar.

A hipoxia é apenas um preço que é pago por células desprovidas da proximidade do sistema circulatório. Células também requerem interações efetivas com a vascularização com o objetivo de adquirirem nutrientes e, assim, derramarem produtos de lixo metabólico e dióxido de carbono. As redes capilares que fazem seu caminho através de muitos tecidos normais são arrançadas tão densamente que virtualmente todas as células em um tecido não estão a mais de alguns diâmetros de distância do capilar mais próximo (Figura 13.29). Em alguns tecidos normais com uma atividade metabólica especialmente alta, a maioria das células tem contato direto com pelo menos um capilar. Essa íntima associação significa que seu acesso a oxigênio e nutrientes críticos não é dependente da difusão dessas moléculas por grandes distâncias e por camadas celulares empacotadas densamente.

Tais observações ilustram a importância central da vascularização para o crescimento e sobrevivência de todos os tipos de tecidos, normais e neoplásicos. O processo de desenvolvimento dessa vascularização por meio da angiogênese pode ser observado durante o desenvolvimento embrionário, a implantação da placenta, a cicatrização de lesão e certas condições patológicas tais como retinopatia diabética, psoríase, artrite reumatóide e, com certeza, tumorogênese.

Durante o desenvolvimento embrionário, o tamanho e a arquitetura completa de um órgão ou tecido são geneticamente programados, mas a precisa localização desses componentes

celulares individuais não é. Isso também se aplica à vascularização: o genoma determina o completo esboço dos principais vasos e delega às células individuais dentro dos tecidos a tarefa de desenhar e juntar a rede de capilares locais e de vasos levemente maiores. Interações heterotípicas operando sob curtas distâncias determinam a rota de capilares individuais constituindo a microvascularização. Mais especificamente, capilares parecem formar-se em qualquer lugar onde sejam necessários pelas células não-vascularizadas (i. e., **parênquima**) em um tecido.

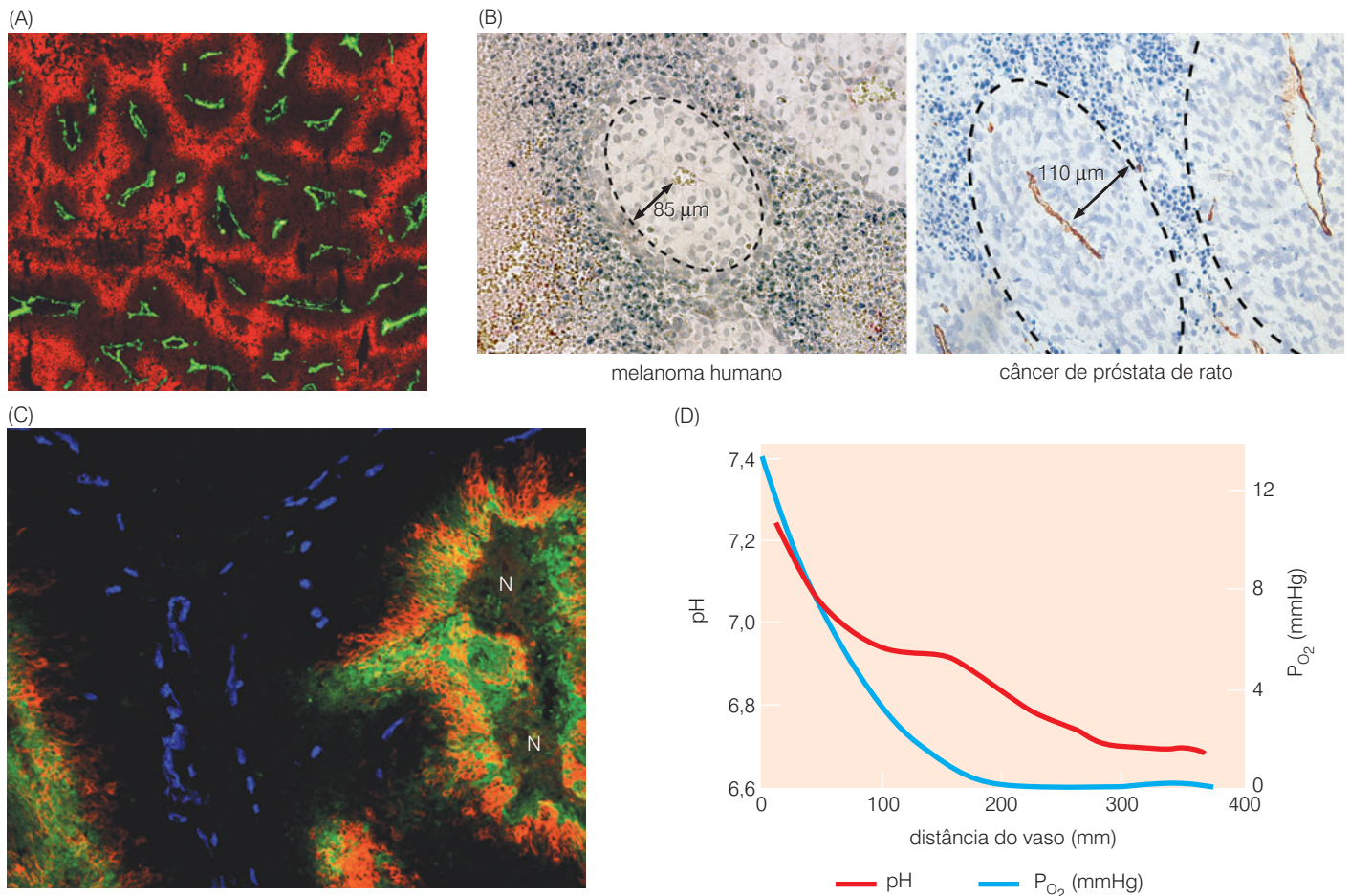
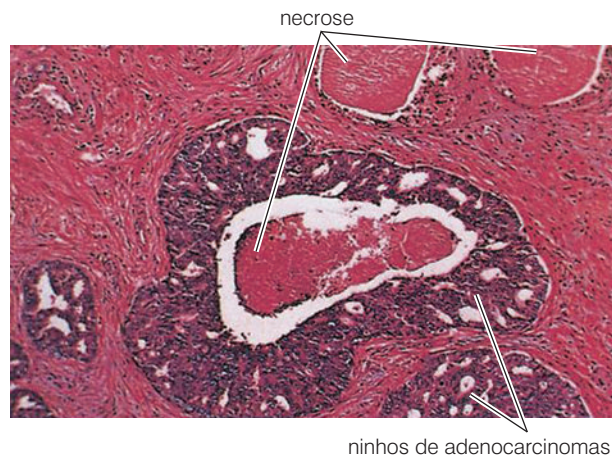


Figura 13.27 Hipoxia e necrose de células em secções de tecidos pouco vascularizados. Várias técnicas têm sido usadas para demonstrar hipoxia e necrose em regiões do tecido que circundam capilares. (A) Esta imagem micrográfica revela capilares (verde), bem como o grau de oxigenação no parênquima em volta do tumor. Imunomarcagem usando um anticorpo reativo com EF5, uma molécula que localiza a região de hipoxia do tecido, revela áreas que são hipóxicas (vermelho) há alguma distância dos capilares, enquanto aquelas células que são bem-oxigenadas não são coradas e, portanto, aparecem em marrom-escuro. (B) Esta secção de um melanoma humano (painel da esquerda) e de um carcinoma de próstata de rato (painel da direita) foi imunomarcada com anticorpo anti-CD31, o qual revela capilares (marrom). Imediatamente ao redor de cada capilar, uma região de células saudáveis é aparente. Entretanto, além do perímetro (linha pontilhada) circundando cada capilar, uma região de necrose (região granular) é aparente. A região necrótica começa próximo de 85 μm a partir do capilar de melanoma (esquerda) e 110 μm do capilar de carcinoma de próstata (direita). Esta necrose revela as limitações da difusão em transportar oxigênio e nutrientes dos capilares para as células no parênquima tumoral. (C) As dinâmicas de oxigenação em uma escala maior são aparentes neste tumor humano de células

escamosas de cabeça e de pescoço. Vasos sanguíneos (pontos azuis) providenciam boa oxigenação do tumor, que aparece em preto. Entretanto, em áreas de pouca vascularização e hipoxia moderada, uma enzima anidrase carbônica é expressada (vermelho), enquanto em áreas de extrema hipoxia, o corante pimonidazol é detectável (verde). A sobreposição entre esses dois marcadores aparece em laranja. Áreas de necrose, mesmo que localizadas mais distantes da vascularização do tumor, são indicadas por "N". (D) Uso de corantes indicadores e microscopia intravital tornam possível medir o pH e P_O₂ (tensão de oxigênio parcial) em microambientes localizados a várias distâncias de um vaso sanguíneo. Essas medidas explicam as principais causas de necrose em áreas pouco vascularizadas: a pressão do oxigênio cai a zero a uma distância de mais que 0,2 mm, ao passo que o pH cai a níveis que são incompatíveis com o metabolismo celular normal, uma consequência da produção de ácido láctico ocorrendo sob condições anaeróbicas. (A, cortesia de B.M. Fenton; B, esquerda, cortesia de N. Almog e M.J. Folkman; B, direita, de L. Hltaky, P. Hahnfeldt e J. Folkman *J. Natl. Cancer Inst.* 94:883-893, 2002; C, de J.H. Kaanders, K.J. Wijffels, H.A. Marres et al., *Cancer Res.* 62:7066-7074, 2002; D, de G. Helmlinger, F. Yuan, M. Dellian e R.K. Jain, *Nat. Med.* 3:177-182, 1997.)

Figura 13.28 Necrose em larga escala dentro de um tumor A inabilidade de amplos setores de um tumor em ganhar acesso à vascularização presente no estroma é demonstrada por este adenocarcinoma de alto grau da próstata. Como visto mais claramente no crescimento do centro, um ninho de células de adenocarcinoma (vermelho-escuro) está circundado por extensivo estroma (vermelho-claro). No meio do ninho das células de adenocarcinoma, está uma grande porção de tecido necrótico (vermelho-claro) que se afastou das células de adenocarcinoma viáveis que o circundam; estas últimas tiveram sucesso, pois tinham um melhor acesso ao estroma e à vascularização associada. (De A.T. Skarin, Atlas of Diagnostic Oncology, 3rd ed. Philadelphia: Elsevier Science Ltd., 2003.)

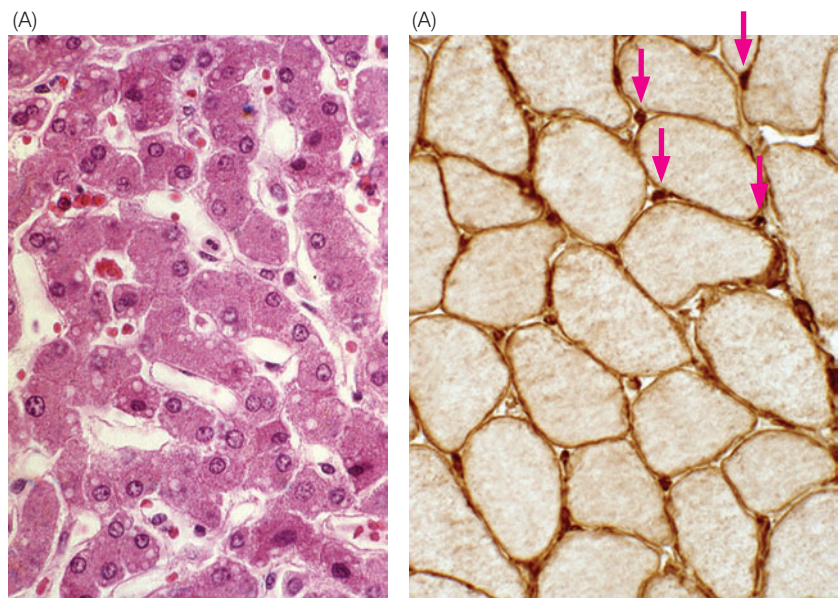


Uma variável desse plano opera durante a tumorigênese. A arquitetura geral de tumores não pode ser determinada pelo genoma de um organismo, já que cada tumor que surge é uma invenção nova cujo desenho não é antecipado pelo genoma. Isso tem implicações para a angiogênese do tumor também: os tumores não podem contar com alguns desenhos genéticos para ajudá-los na configuração do seu suprimento de sangue e devem, em vez disso, desenhar o esboço da sua própria vascularização, fazendo isso passo a passo conforme eles crescem. Em particular, quando organizam seu próprio fornecimento sanguíneo, os tumores dependem totalmente das interações heterotípicas localizadas entre as células da vascularização (incluindo células endoteliais, pericitos e células da musculatura lisa) e as células não-vascularizadas nos tumores (incluindo as células neoplásicas e outros tipos celulares do estroma de suporte).

Já aprendemos as duas maneiras pelas quais tumores organizam sua vascularização. Miofibroblastos no estroma associado a tumor pode liberar sinais quimiotáticos, tais como SDF-1/CXCL12, que ajudam a recrutar células endoteliais precursoras circulantes para o estroma (veja a Figura 13.22). Esse recrutamento é provavelmente ajudado pela liberação de VEGF, que ajuda também essas células a amadurecerem em células endoteliais funcionais.

Como foi descrito na Seção 7.12, a produção de VEGF é governada pela disponibilidade de oxigênio. Assim, muitos tipos de células tomam choques de sua própria tensão de oxigênio

Figura 13.29 Microvascularização densa em fígado e músculo Devido à alta taxa metabólica, alguns tecidos desenvolvem uma densidade muito alta de capilares, garantindo que cada célula tenha contato direto com células endoteliais e os capilares que elas formam. (A) Virtualmente cada hepatócito no fígado é adjacente a um espaço, chamado um *sinusóide*, que é delineado por células endoteliais e serve como um capilar. (B) Cada fibra muscular, imunocorada com um anticorpo antilaminina, é uma simples célula sincicial, formada pela fusão de vários mioblastos. Cada fibra muscular encontra-se adjacente a um ou mais capilares (setas, pontos marrom-escuro). (A, de Loyola University Medical Education Network; B, de Washington University of St. Louis Neuromuscular Disease Center.)



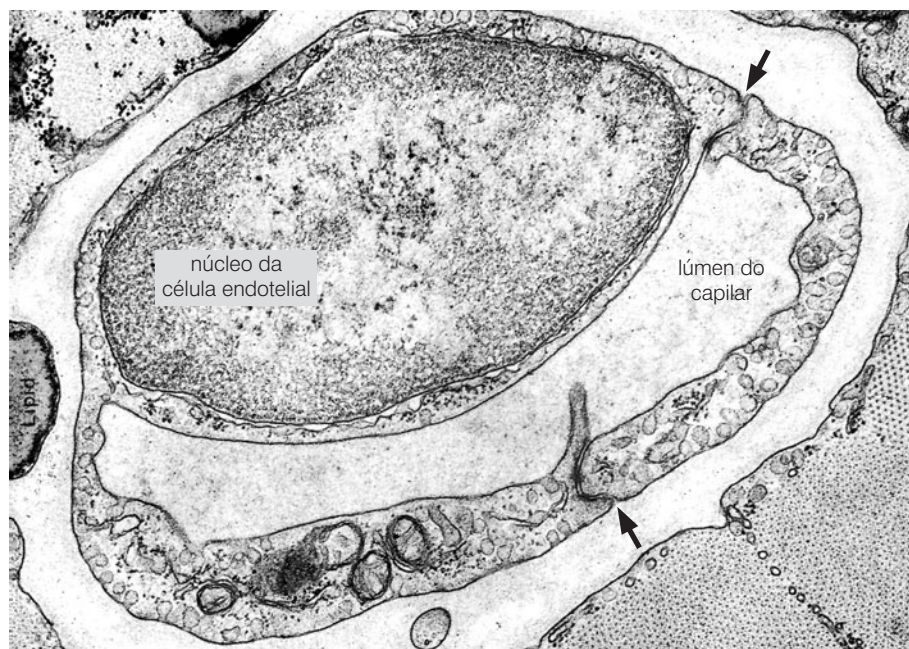


Figura 13.30 Células endoteliais e a formação de capilares Esta micrografia eletrônica de transmissão revela a seção cruzada através de um capilar no meio de músculos cardíacos e mostra como os citoplasmas de duas células endoteliais se uniram (setas) para formar o lúmen de um capilar. O fechamento estreito da membrana plasmática de células endoteliais adjacentes uma a outra resulta em tubos de capilares cujas paredes são contínuas e geralmente sem lacunas. O núcleo de uma das células endoteliais também é visto. (De D.W. Fawcett, *J. Histochem. Cytochem.* 13:75-91, 1965.)

intracelular por meio das ações das proteínas VHL e suas companheiras. Sob condições de hipóxia, esse complexo de proteínas permite o acúmulo do fator de transcrição HIF-1 funcional, que, por sua vez, promove a expressão de vários genes cujos produtos favorecem a angiogênese. Proeminente entre esses, está o VEGF. A produção desse fator angiogênico chave tem sido associada a células tumorais, macrófagos e miofibroblastos, dependendo do tipo de tumor e seu estágio de progressão. (Na verdade, existem duas proteínas funcionalmente similares, estruturalmente relacionadas, chamadas de VEGF-A e VEGF-B. Continuaremos utilizando o termo genérico VEGF para nos referirmos a ambas.)

Como muitos outros fatores de crescimento, VEGF funciona como um ligante de receptores de tirosina cinase – nesse caso, o receptor 1 de VEGF (também chamado Flt-1) e o receptor-2 de VEGF (conhecido também como Flk-1/KDR). Ambos estão dispostos na superfície de células endoteliais. Similarmente, o fator de crescimento de fibroblasto básico (bFGF), outro fator angiogênico importante, se liga ao seu próprio receptor cognato apresentado por células endoteliais. Uma vez estimuladas por esses fatores angiogênicos, as células endoteliais proliferam e contornam seus citoplasmas para construir as paredes cilíndricas dos capilares. (Figura 13.30). Esses capilares também penetram através de camadas de tecidos existentes, movendo-se em direção a uma maior concentração localizada de fatores angiogênicos.

Mecanismos similares parecem operar durante a formação de vasos linfáticos (Barra lateral 13.5). Conforme veremos mais adiante neste capítulo, ductos linfáticos são importantes reguladores do balanço fluido no estroma do tumor. No próximo capítulo, eles assumirão grande importância, já que fornecem caminhos para que células cancerosas fujam de tumores primários e disseminem-se para locais distantes no corpo.

A existência e os poderes de fatores angiogênicos foram primeiramente revelados pela implantação de pequenos aglomerados de tumor na córnea ou nas orelhas de animais de laboratório, como coelhos. Dentro de alguns dias, densas redes de capilares e grandes vasos podem ser vistos emergindo a partir de capilares preexistentes e convergindo para os aglomerados de tumores implantados. Imagens como essas (Figura 13.32A) têm influenciado muito o que pensamos sobre o comportamento de tumores e sua vascularização, pois elas demonstram vividamente que tumores ativos recrutam vasos sanguíneos para seu interior.

A formação de capilares sanguíneos é, na verdade, muito mais complicada do que é sugerido por essas descrições de angiogênese. Por um lado, esse complexo processo morfogênico

Barra lateral 13.5 Células endoteliais também constroem ductos linfáticos Os ductos linfáticos possuem duas funções principais na fisiologia normal. Eles drenam fluido dos interstícios entre células e esvaziam esse fluido dentro da circulação venosa. Além disso, eles permitem que células apresentadoras de antígeno do sistema imune transportem antígenos de vários tecidos para os nódulos linfáticos, nos quais as respostas imunes são frequentemente iniciadas (Capítulo 15).

De maneira interessante, ductos linfáticos são montados por células endoteliais originárias da mesma população de células-tronco embrionárias que produziram as células endoteliais dos capilares e grandes vasos sanguíneos. Durante o desenvolvimento embrionário, vasos linfáticos podem frequentemente ser observados por brotarem de capilares em desenvolvimento antes que estes se separem, construindo sua própria rede paralela de vasos interconectados (Figura 13.31). Além

disso, os fatores que estimulam a **linfangiogênese** – os fatores de crescimento endotelial vascular C e D (VEGF-C e VEGF-D) – são homólogos a VEGF-A e B, que possuem um papel importante na estimulação da angiogênese que cria a vascularização sanguínea.

Conforme pode ser esperado, o receptor para VEGF-C e VEGF-D apresentado por células endoteliais linfáticas – receptor 3 de VEGF (VEGF-R3) – é estruturalmente relacionado ao receptor dominante VEGF de capilares sanguíneos, VEGF-R2. Além disso, há uma evidência clara de que VEGF-D, o qual é responsável principalmente por guiar a linfangiogênese, pode também ajudar a estimular angiogênese por ligar e ativar VEGF-R2. Então, esses dois sistemas – as redes sanguíneas e linfáticas – derivam de raízes evolutivas comuns, desenvolvendo-se de precursores comuns no embrião, continuando a interagir um com o outro de maneiras complexas dentro de tecidos adultos.

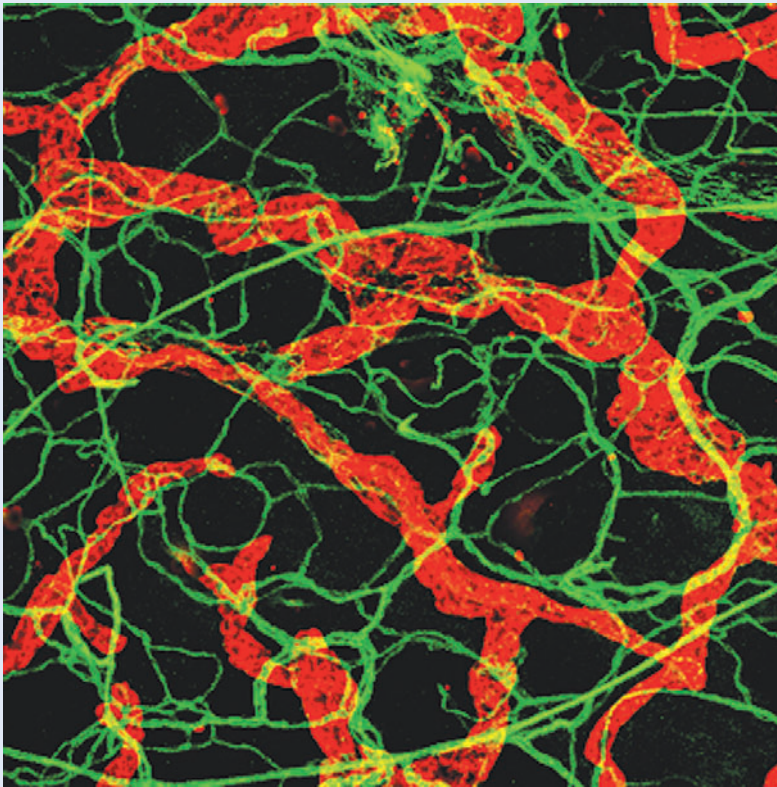


Figura 13.31 Rede de vasos linfáticos e capilares A maioria dos tecidos está interlaçada por uma rede de capilares (verde) e vasos linfáticos (laranja-avermelhado). Como aparente aqui, os diâmetros dos vasos linfáticos são muito maiores do que os dos capilares. Diferentemente dos capilares, no entanto, as células endoteliais de vasos linfáticos não são suportadas por uma base de células murais – pericitos e células de musculatura lisa. (Cortesia de T. Tammela e K. Alitalo.)

envolve diversos outros fatores além de VEGFs, os quais claramente desenvolvem uma função majoritária na atração de vasos sanguíneos para tumores (Figura 13.32B). Esses outros fatores incluem inúmeras formas de TGF- β , fatores de crescimento de fibroblasto básico (bFGFs), interleucina-8 (IL-8), angiopoietina, angiogenina e PDGF. Além disso, inúmeros tipos celulares distintos, além de células endoteliais, contribuem para a construção de capilares e vasos maiores. Conforme mencionado, as células endoteliais formam o lúmen de um capilar, os quais, por sua vez, são circundados por pericitos de parede e células de musculatura lisa vascular (Figura 13.6).

A cobertura sistemática de capilares pelos pericitos vista em tecidos normais (veja a Figura 13.6B) pode ser contrastada com sua dispersão caótica perto dos capilares associados ao tumor (Figura 13.33). Capilares em tumores tipicamente têm diâmetros que são três vezes maiores do que seus representantes normais. Além disso, o arranjo geral de vasos sanguíneos ao redor e dentro das massas tumorais é bastante caótico (Figura 13.34). Com frequência, vasos param abruptamente em bolsas sem saída ou circulam de volta e se ligam nelas mesmas. Em nível sub-microscópico, também é aparente que os capilares em massas tumorais são

organizados aleatoriamente. Isso porque as membranas plasmáticas de células endoteliais adjacentes não têm contato uma com a outra para formar um delineamento sem sutura ao redor do lúmen do capilar, mas, em vez disso, deixam lacunas, freqüentemente com inúmeros microns de comprimento (Figura 13.35), que permitem o acesso direto do plasma sanguíneo para as células que circundam o capilar. O escapamento resultante parece ser responsável pela deposição de fibrina no parênquima de tumor descrito anteriormente.

Medidas quantitativas indicam que as paredes dos capilares em tumores são cerca de 10 vezes mais permeáveis do que aquelas de capilares normais. Alguns desses vazamentos são atribuídos à montagem defeituosa de paredes de capilar mostrada nesta seção. Mas isso, por si só, não é suficiente para explicar todos esses vazamentos. Em vez disso, a maioria parece ser devida à produção desregulada de VEGF dentro dos tumores (Barra lateral 13.6).

As razões precisas pelas quais capilares e vasos maiores dentro de tumores são construídos tão ao acaso não estão claras. Um fator possível pode dispor-se do balanço entre dois fatores de crescimento mutuamente antagonistas, as angiopoietina 1 e 2. Enquanto VEGF é responsável por iniciar o crescimento de capilares atraindo e estimulando células endoteliais, um misto de angiopoietina-1 e 2 induz as células endoteliais a recrutarem os pericitos e células musculares lisas que permitem que capilares recentemente formados amadureçam dentro de vasos bem-construídos contendo proporções apropriadas desses três tipos celulares.

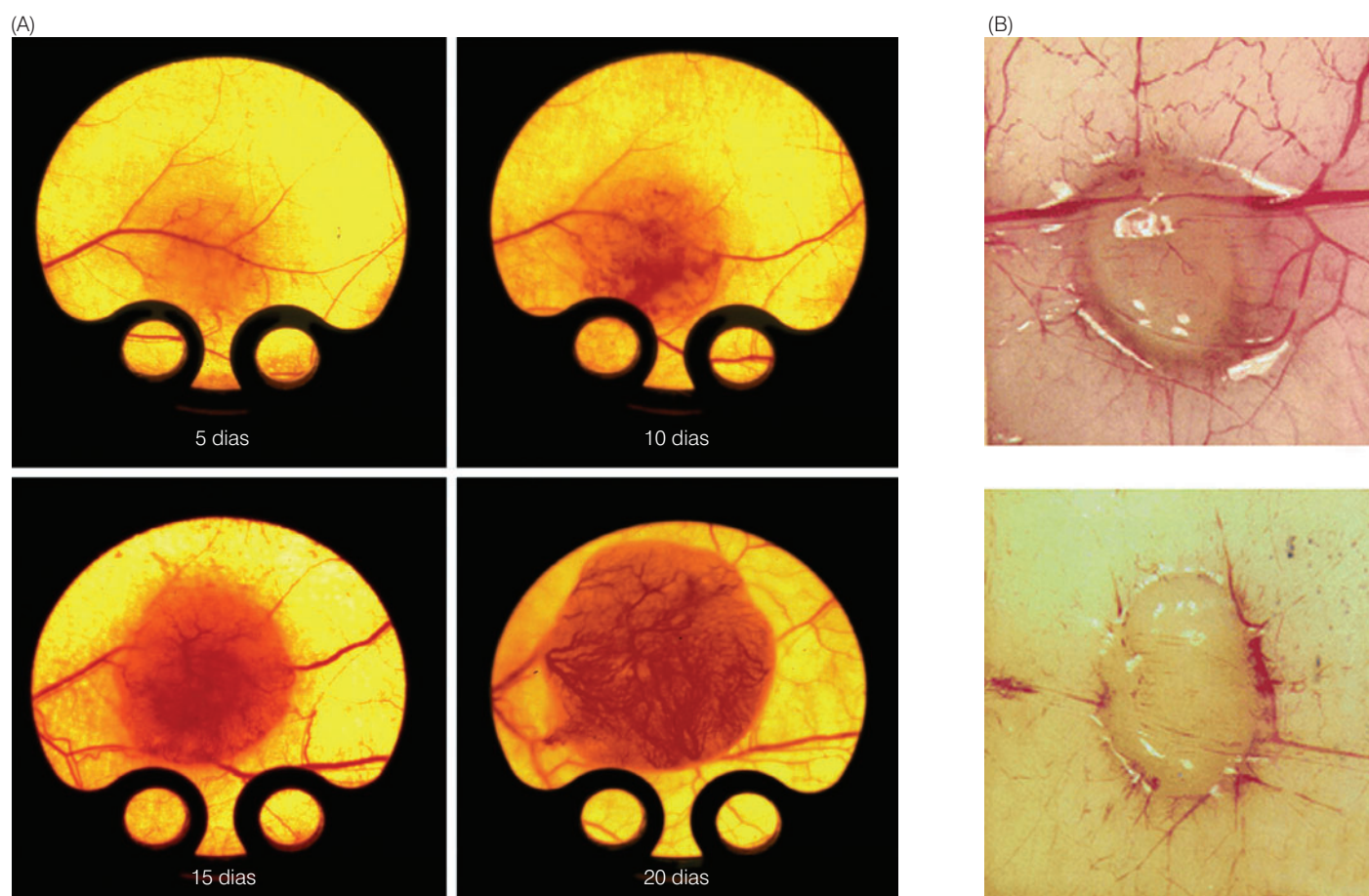


Figura 13.32 Recrutamento de capilares por um tumor implantado (A) Estas imagens mostram o crescimento de um pequeno grupo de células de adenocarcinoma colorretal humano implantadas subcutaneamente por um período de 20 dias. O crescimento dos vasos associados ao tumor é observado através de uma janela que foi inserida na pele de um camundongo acima do tumor. (B) Tal vascularização pode ser suprimida por antagonistas do receptor VEGF. Vistos aqui, estão os efeitos do ZD6474, um inibidor do

receptor VEGF, em camundongos possuidores de células de adenocarcinoma humano enxertadas. O fundo rosa espalhado no camundongo controle não-tratado, que é indicativo do número de capilares, e o número de vasos principais entrando em uma massa tumoral (topo) estão fortemente diminuídos na presença da droga (inferior). (A, de M. Leunig, F. Yuan, M.D. Mnger et al., *Cancer Res.* 52:6553-6560, 1992; B, de S.R. Wedge, D.J. Ogilvie, M. Dukes et al., *Cancer Res.* 62:4645-4655, 2002.)

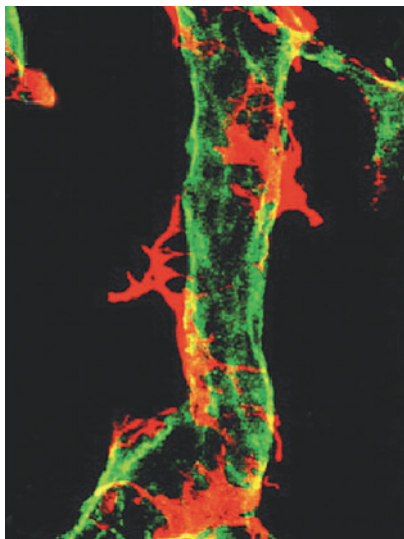
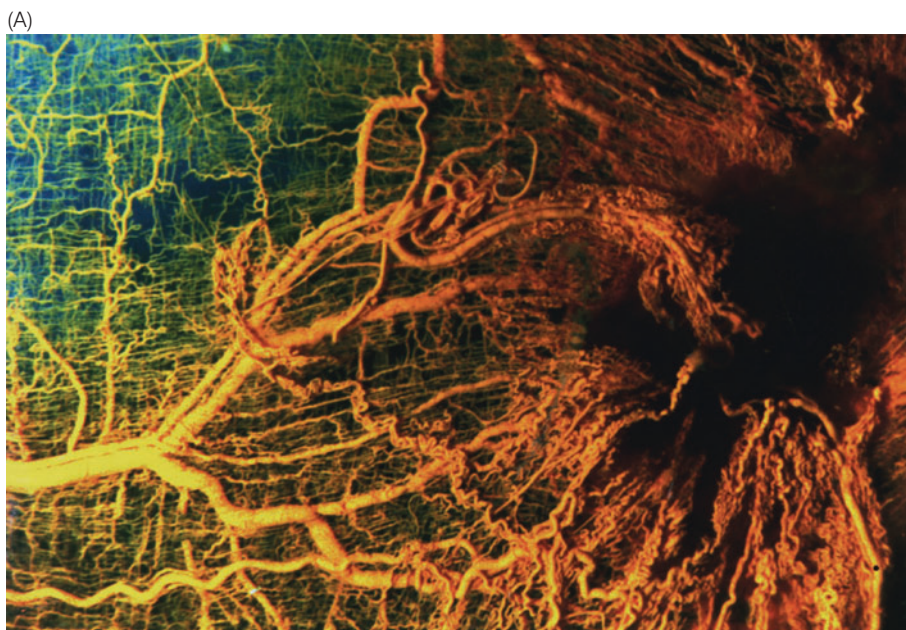


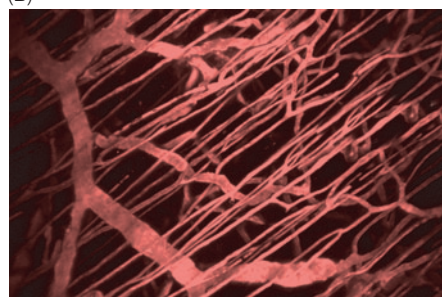
Figura 13.33 Pericitos associados ao tumor Esta micrografia por fluorescência revela a estrutura de um microvaso associado a tumor, neste caso um vaso formado em um camundongo por células de carcinoma pulmonar de Lewis (LLC). As células endoteliais que formam o lúmen deste vaso (verde) são somente parcialmente cobertas por pericitos e células de musculatura lisa (laranja-avermelhado). A ligação frouxa de pericitos aos capilares pode ser contrastada à sua ligação estreita vista na Figura 13.6B. (De S. Morikawa, P. Baluk, T. Kaidoh et al., *Am. J. Pathol.* 160:985-1000, 2002.)

Um desequilíbrio dessas duas angiopoietinas antagonistas, junto com elevados níveis de VEGF dentro dos tumores, pode ser responsável por muitos dos defeitos de construção dos capilares e vasos maiores dentro de neoplasmas.

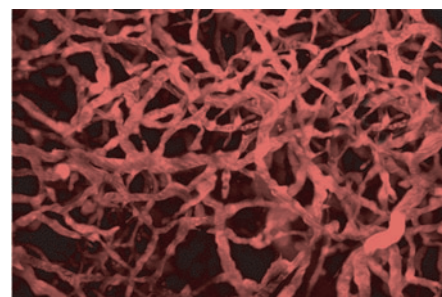
O vazamento de capilares associados ao tumor leva ao acúmulo de quantidades substanciais de fluido nos espaços parenquimais em um tumor. Em tecidos normais, esses fluidos são drenados por vasos linfáticos, os quais eventualmente esvaziam seu conteúdo dentro da circulação venosa (Barra lateral 13.5). Entretanto, entre tumores sólidos, a progressiva expansão de populações de células cancerosas exerce pressão naqueles poucos vasos linfáticos que realmente sucederam na formação, causando seu colapso (Figura 13.36). (Capilares sangüíneos possuem uma capacidade maior de resistirem a essa pressão, devido a sua própria pressão hidrostática interna significativa, ausente em vasos linfáticos.) As drenagens linfáticas defeituosas resultantes dentro dos centros de tumores sólidos mais adiante exacerbam o acúmulo



(A)



tecido normal



tumor

Figura 13.34 A organização caótica da vascularização associada ao tumor (A) Esta imagem, obtida por injeção de uma resina dentro dos vasos sangüíneos antes da fixação tecidual, mostra que a vascularização que alimenta uma massa de células tumorais (área preta, bem à direita) é tortuosa e pouco organizada, em contraste com a vascularização bem-organizada em tecidos normais (área turquesa, topo, à esquerda). (B) Técnicas de imagem de tecidos vivos (imagem *intravital*) tornaram possível a visualização de alicerces de capilares de tecidos normais e neoplásicos. Esta técnica revela que as redes de capilares em um tecido normal são bem-organizadas (esquerda), enquanto aquelas em um tumor são caóticas (direita). (A, cortesia de L. Heiser e R. Ackland, University of Louisville; B, de R.K. Jain, *Nat. Med.* 9:685-693, 2003.)

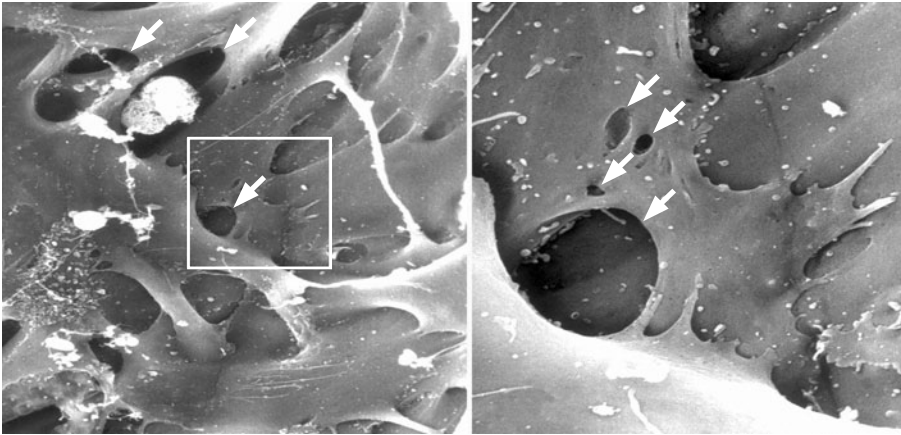


Figura 13.35 Varredura EM de lacunas em vascularização de tumor Esta micrografia eletrônica de varredura revela que as lâminas de células endoteliais, as quais formam uma superfície contínua e ininterrupta ao redor das paredes de um capilar normal (*não-mostrado*), falham ao fazer isso em um capilar dentro de um tumor. Em vez disso, as células endoteliais associadas ao tumor se sobrepõem umas às outras e, conforme indicado aqui (*setas*), apresentam lacunas de tamanho significativo entre elas. A caixa no *painel da esquerda* é apresentada em maior aumento no *painel da direita*. Tais lacunas permitem a infiltração de fluido plasmático para os espaços intersticiais entre as células cancerosas, contribuindo para alta pressão hidrostática nesses espaços. (De H. Hashizume, P. Baluk, S. Morikawa et al., *Am. J. Pathol.* 156:1363-1380, 2000.)

elevado de fluido causado por escoamento de capilar, gerando pressão relativamente alta de fluido nas partes não-vascularizadas dos tumores. Essa pressão, por sua vez, complica muito a administração de drogas terapêuticas anticâncer.

13.7 Falhar na troca angiogênica é essencial para a expansão do tumor

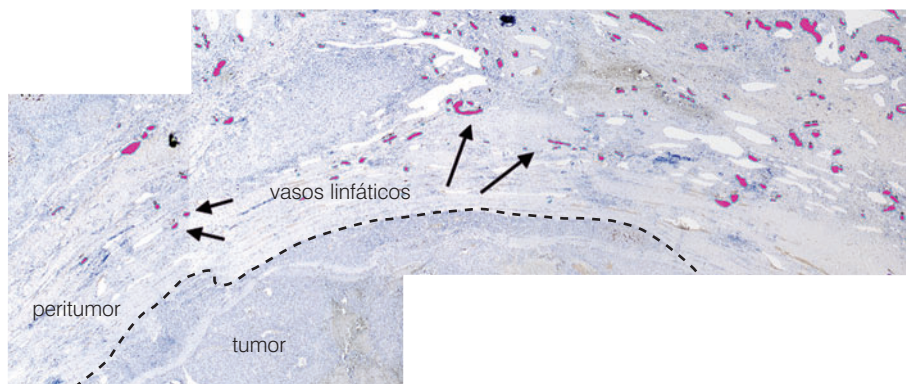
As descrições de angiogênese apresentadas anteriormente, assim como aquelas apresentadas em outro capítulo (veja a Seção 7.12), pareceriam sugerir que a liberação de fatores angiogênicos é virtualmente automática: sempre que grupos de células, incluindo células cancerosas, sofressem hipoxia, eles liberariam fatores angiogênicos e, portanto, provocariam o crescimento de capilares para o seu interior. Isso curaria a hipoxia e resultaria em uma densidade apropriada de capilares no tecido possuidor dessas células.

De fato, a habilidade de atrair vasos sanguíneos parece ser uma característica que falta inicialmente em muitas populações de células tumorais e deve ser adquirida conforme a progressão do tumor ocorre. Essa idéia foi inicialmente sugerida pela observação, citada anteriormente, de que em alguns tumores, células cancerosas obtêm sucesso próximo dos capilares, mas aquelas que estão localizadas a uma distância de 0,2 mm dos capilares param de crescer e podem entrar em apoptose

Barra lateral 13.6 Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) causa permeabilidade dos capilares Duas linhas independentes de pesquisa levaram à clonagem inicial de genes que codificam VEGF-A. Um projeto de pesquisa caracterizou um fator secretado por células cancerosas que fizeram com que vasos sanguíneos vazassem um fluido que foi chamado, portanto, de fator de permeabilidade vascular (VPF). O outro trabalho se focou em um fator liberado por tumores que funcionaram como atração e também como mitógenos para células endoteliais que se organizam para formar as paredes do lúmen dos capilares; esse agente foi chamado fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) – o nome que prevalece hoje. As duas pesquisas culminaram, em 1989, em isolados independentes de genes que codificam VPF e VEGF e na descoberta de que eles são o mesmo. Células cancerosas, assim como macrófagos e fibroblastos no estroma associado ao tumor, continuamente liberam quantidade significativa de VEGF, que são responsáveis pela maior parte da permeabilidade elevada de capilares e vênulas associadas ao tumor.

Os mecanismos precisos responsáveis pela permeabilidade induzida por VEGF permanecem obscuros. VEGF pode fazer com que as membranas plasmáticas de células endoteliais adjacentes separem-se levemente, gerando lacunas entre elas. Além disso, ele pode estimular células endoteliais a transportarem fluidos e solutos através de seu citoplasma, a partir do lúmen para a superfície **abluminal**.

Figura 13.36 Ausência de vasos linfáticos dentro de tumores sólidos A análise de uma secção de um carcinoma hepatocelular (HCC; câncer de fígado), usando um anticorpo que cora especificamente ductos linfáticos (vermelho-escuro), revela que esses ductos estão presentes em tecidos normais acima da margem do tumor (linha pontilhada), mas são ausentes dentro de uma massa tumoral em si. Essa ausência pode ser atribuída (1) ao fato de que tais ductos não foram gerados inicialmente durante a formação de tumor e/ou (2) ao colapso e degeneração desses ductos devido à alta pressão hidrostática dentro de tumores sólidos. (De C. Mouta Carreira, S.M. Nasser, E. di Tomaso et al., *Cancer Res.* 61:8079-8084, 2001.)



ou tornar-se necróticas (Seção 13.6). Então, mesmo que essas células cancerosas sofressem hipóxia, faltaria a elas a habilidade de induzir a formação de capilares próximos.

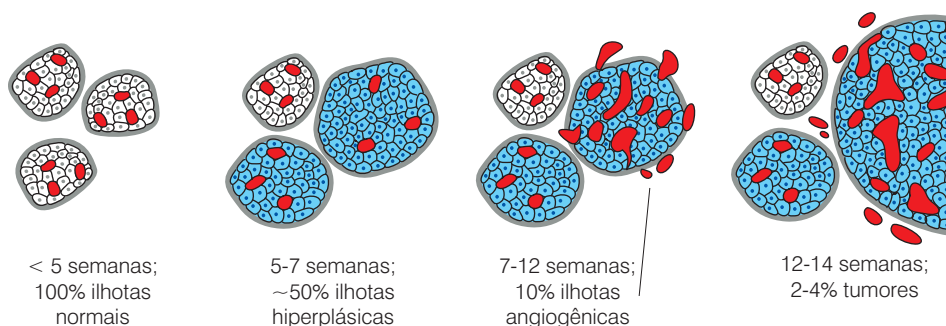
Sabe-se muito sobre essa dinâmica a partir de estudos detalhados de modelos experimentais de tumorigênese. O mais informativo destes tem sido o do camundongo transgênico Rip-Tag. Ele carrega um transgene em sua linhagem germinativa, no qual a expressão de antígeno large T de SV40 (Seção 8.5 e 9.1) e antígeno small T é guiada pelo promotor do gene da insulina. Esse promotor assegura a expressão dessas oncoproteínas virais em células β que formam as ilhotas de Langerhans no pâncreas (nas quais a insulina é normalmente produzida).

A progressão do tumor nas 400, ou mais, ilhotas do pâncreas do camundongo pode ser facilmente seguida, visto que essas ilhotas podem ser facilmente distinguidas dos tecidos circundantes do pâncreas **exócrino**, o qual está envolvido na produção e secreção de enzimas digestivas. Até metade dessas ilhotas do camundongo Rip-Tag formam nódulos hiperplásicos de 10 semanas de idade, e 8 a 12% de ilhotas hiperplásicas finalmente progridem para se tornarem angiogênicas, isto é, elas adquirem a habilidade de recrutar novos vasos sanguíneos para o seu interior. Em 12 a 14 semanas, cerca de 3% das ilhotas hiperplásicas formadas inicialmente, finalmente progridem para formar carcinomas (Figura 13.37).

Figura 13.37 O modelo Rip-Tag da progressão tumoral de células da ilhota A tumorigênese de múltiplas etapas no modelo Rip-Tag de camundongos transgênicos progride em estágios distintos. Uma ilhota pancreática normal (também conhecida como uma ilhota de Langerhans; esquerda) carrega um pequeno número de capilares para suportar as células β . Por volta de 5 a 7 semanas de idade, cerca de metade dessas ilhotas se tornam hiperplásicas, mas a densidade dos vasos sanguíneos não é aumentada. Durante um período subsequente de 7 a 12 semanas, cerca de 10% das ilhotas hiperplásicas se tornam angiogênicas, conforme indicado pelo aumento da densidade dos capilares nas redondezas, próximas ao pâncreas exócrino. Finalmente, por volta de 12 a 14 semanas de vida, 2 a 4% das ilhotas hiperplásicas formadas inicialmente tornaram-se carcinomas invasivos que crescem rapidamente e invadem as redondezas do pâncreas exócrino. O pâncreas exócrino que circunda as ilhotas não é mostrado aqui. (De D. Hanahan e J. Folkman, *Cell* 86:353-364, 1996.)

Cedo na progressão de tumores em camundongos Rip-Tag, ilhotas pancreáticas hiperplásicas começam a expandir levemente para um pequeno diâmetro de cerca de 0,1 a 0,2 mm e então param sua marcha adiante (veja a Figura 13.37), pelo menos por um tempo. Nesses pequenos ninhos de células tumorais, a divisão celular continua sem pausa, sendo guiada pelo transgene oncogênico. Entretanto, o tamanho total da população de células tumorais de cada ilhota permanece constante, por causa de um atrito compensativo de células que ocorre por meio de apoptose. Esse modelo de camundongo sugere que, em humanos, pequenos ninhos de tumor podem também permanecer nesse estado dinâmico, mas sem crescimento, por muitos anos, incapazes de romper as barreiras que estão impedindo o seu desenvolvimento.

Em princípio, os obstáculos para expansão de ninhos de células tumorais podem ser uma barreira física – a falta de espaço adequado no tecido para que essas células cancerosas se



multipliquem. Mas a análise histológica detalhada desses pequenos ninhos de células cancerosas revela algo muito diferente. Já que essas células ainda não se tornaram angiogênicas, elas não possuem vascularização. A hipóxia resultante que elas sofrem aciona a apoptose dependente de p53, que explica sua alta taxa de atrito. (É possível que outras condições subótimas nesses ninhos celulares pouco vascularizados – que incluem o suprimento inadequado de nutrientes, altos níveis de dióxido de carbono e lixo metabólico – e baixo pH, causado pelo acúmulo de ácido lático, também contribuam para a morte de tais células.)

Em algum ponto no tempo, entretanto, pequenos grumos dessas ilhas de células pré-neoplásicas instantaneamente adquirem a habilidade de provocar neoangiogênese (veja a Figura 13.37). Uma vez que tais células aprendem como induzir a formação de capilares ao seu redor, elas e suas descendentes parecem ser liberadas do obstáculo principal que estava controlando sua multiplicação. Essa mudança repentina e dramática no comportamento de pequenas massas tumorais foi chamada de “troca angiogênica”.

Tais fenômenos sugerem uma idéia interessante – na verdade, uma especulação: o corpo intencionalmente nega a essas células a habilidade de induzir prontamente a angiogênese. Por fazer isso, ele produz ainda outro impedimento para bloquear o desenvolvimento de grandes neoplasmas. De acordo com tal pensamento, a troca angiogênica – uma etapa claramente importante na progressão do tumor – representa o rompimento bem-sucedido desse obstáculo defensivo e a aquisição de um fruto proibido pelas células cancerosas: a habilidade de induzir crescimento de vasos sanguíneos de acordo com sua vontade.

Pode-se concluir que a troca angiogênica nesses camundongos transgênicos é guiada pelas células β pré-malignas que subitamente adquirem a habilidade de expressar e liberar VEGFs. Na verdade, essas células produzem grandes quantidades de VEGFs muito antes de ocorrer a troca angiogênica, como fazem as ilhotas pancreáticas normais. Entretanto, moléculas de VEGF secretadas pelas células β são eficientemente isoladas por essa matriz extracelular circundante (ECM). Como consequência, as moléculas de VEGF são incapazes de estimular angiogênese.

Esse estado isolado de VEGF explica por que a troca angiogênica em ilhotas pancreáticas de Rip-Tag é acompanhada pelo súbito aparecimento de quantidades substanciais de metaloproteinase 9 de matriz (MMP-9; Seção 13.5). MMP-9 age em um alvo para clivar componentes de estrutura específica de ECM, dessa forma liberando e mobilizando VEGF para ativar a sinalização de células endoteliais próximas. Essa MMP-9 é sintetizada e liberada por células inflamatórias – células de mastócitos e, muito possivelmente, macrófagos – que foram atraídas para as ilhotas pré-malignas (Barra lateral 13.7). Portanto, nesse tecido em particular, falhar na troca angiogênica, no final das contas, depende da aquisição de habilidade para recrutar células inflamatórias.

Se o gene que codifica VEGF é seletivamente deletado de células de ilhota por meio da engenharia genética, as ilhotas sobrevivem, e as etapas anteriores da progressão do tumor procedem normalmente, mas a troca angiogênica nunca ocorre. Isso reforça a conclusão de que moléculas de VEGF originárias de célula da ilhota possuem uma função crítica em desencadear o início da angiogênese, e que células do estroma recrutadas não podem compensar essa ausência de VEGF trazendo alguma de suas semelhantes.

Esse cenário (Figura 13.38) envolve interações heterotípicas entre três tipos celulares distintos: (1) a liberação de sinais ainda não identificados a partir de células pré-malignas de ilhota que recruta células de mastócitos e, muito possivelmente, macrófagos; (2) a liberação de MMP-9 por essas células inflamatórias para ativar o VEGF previamente latente produzido pelas células pré-malignas de ilhota; e (3) a resposta proliferativa de células endoteliais ao VEGF ativado. Na realidade, ainda outros tipos celulares são prováveis parceiros na angiogênese de células de ilhota. Então, muitas das células endoteliais podem derivar do recrutamento de células precursoras endoteliais na circulação (EPCs, algumas vezes chamados de progenitores endoteliais circulantes, ou CEPs); e os capilares que aparecem são finalmente cobertos, embora ao acaso, por outro tipo celular – pericitos – cuja origem não está clara.

Barra lateral 13.7 Mastócitos da medula óssea podem desempenhar uma função-chave na troca angiogênica Camundongos Rip-Tag carregando o transgene da insulina SV40 na sua linhagem germinativa podem ser cruzados com outros que não possuem o receptor do fator de crescimento Kit (veja a Barra lateral 5.7). Kit serve como receptor para fator de célula-tronco (SCF), um importante fator de crescimento que desencadeia o desenvolvimento de certas subclasses de células hematopoiéticas. Dentre outros déficits, camundongos Kit^{-/-} perdem a habilidade de formar mastócitos. Em camundongos Rip-Tag que não possuem receptor Kit, tumores das células de ilhotas são iniciados em taxas rotineiramente observadas em camundongos Rip-Tag padrão. Entretanto, esses tumores nunca progridem para se tornarem angiogênicos, e a taxa de proliferação celular nesses pequenos crescimentos são compensadas por uma taxa equivalente de morte apoptótica. Como consequência, esses tumores permanecem em um tamanho muito pequeno (0,1 a 0,2 mm de diâmetro).

Se esses camundongos são providos com um transplante de medula óssea contendo células precursoras hematopoiéticas tipo selvagem, as quais consertam sua falta de mastócitos, a angiogênese é iniciada nas ilhotas pancreáticas, células tumorais nas ilhotas não são mais perdidas por meio de apoptose e grandes neoplasmas ameaçadores de vida aparecem logo em seguida. Isso prova que a habilidade de provocar angiogênese depende das ações de pelo menos um componente não-endotelial do estroma associado ao tumor – as células de mastócitos originadas na medula óssea. A principal contribuição dos mastócitos para a troca angiogênica parece ser a liberação de MMP-9, que prossegue para a mobilização latente de VEGF, provocando, assim, a angiogênese (veja a Figura 13.38).

De maneira importante, o modelo Rip-Tag não é um exemplo típico do mecanismo angiogênico que ocorre durante a formação de todos os tipos de tumores. Por exemplo, em alguns tumores, a angiogênese parece aumentar progressivamente, como se um controle por reostato esteja sendo trocado gradualmente. Isso contrasta com o comportamento de ilhotas Rip-Tag, no qual um interruptor binário liga-desliga parece estar falhado.

Outros tumores podem depender de fatores angiogênicos diferentes para promover a angiogênese. Por exemplo, quando células-tronco embrionárias transformadas de camundongos são desprovidas de ambas as cópias do gene que codifica VEGF-A, elas perdem quase toda a força para produzir teratomas malignos. Em comparação, fibroblastos da derme de camundongos adultos transformados permanecem altamente tumorogênicos após terem sido privados de ambas as cópias desse gene. Os sarcomas gerados por esses fibroblastos transformados continuam a crescer mesmo quando os camundongos que os carregam foram tratados com um anticorpo que liga e inativa VEGF-R2 (o receptor de célula endotelial primária que confere resposta a ambos, VEGF-A e VEGF-B). Tal comportamento pode ser explicado pelo fato de que fibroblastos da derme transformados podem fazer uma mistura complexa de fatores angiogênicos – incluindo VEGF-B, fatores de crescimento de fibroblastos ácido e

Figura 13.38 A troca angiogênica e o recrutamento de células inflamatórias (A) Uma Ilhota de Langerhans normal (área circular, centro do painel esquerdo) é pouco vascularizada e é sustentada principalmente por meio da difusão de microvasos que a circundam. Após a falha na troca angiogênica, há um aumento no número de células na ilhota, devido à expansão do tumor, e, como visto aqui, uma indução dramática da formação de vasos (painel da direita). A imagem foi obtida por microscopia Wholemount de vasos perfundidos com lecitina. (B) De acordo com este esquema, uma ilhota hiperplásica pré-angiogênica manda sinais à medula óssea e/ou à circulação (não-ilustrado) que leva ao recrutamento de mastócitos e macrófagos. Uma vez na vizinhança das ilhotas, estas liberam metaloproteinases, especialmente MMP-9 (veja a Figura 13.25E). MMP-9, então, cliva componentes da matriz extracelular (ECM), liberando fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) a partir desse estado isolado. VEGF progride para induzir a angiogênese ao redor das ilhotas, falhando, assim, na troca angiogênica. (A, de G. Bergers, D. Hanahan e L.M. coussens, *Int. J. Dev. Biol.* 45:925-1002, 1998; B, adaptada de dados em G. Bergers, R. Brekken, G. McMahon et al., *Nat. Cell Biol.* 2:737-744, 2000; VEGF: Y.A. Muller, B. Li, H.W. Christinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:7192-7197, 1997.)

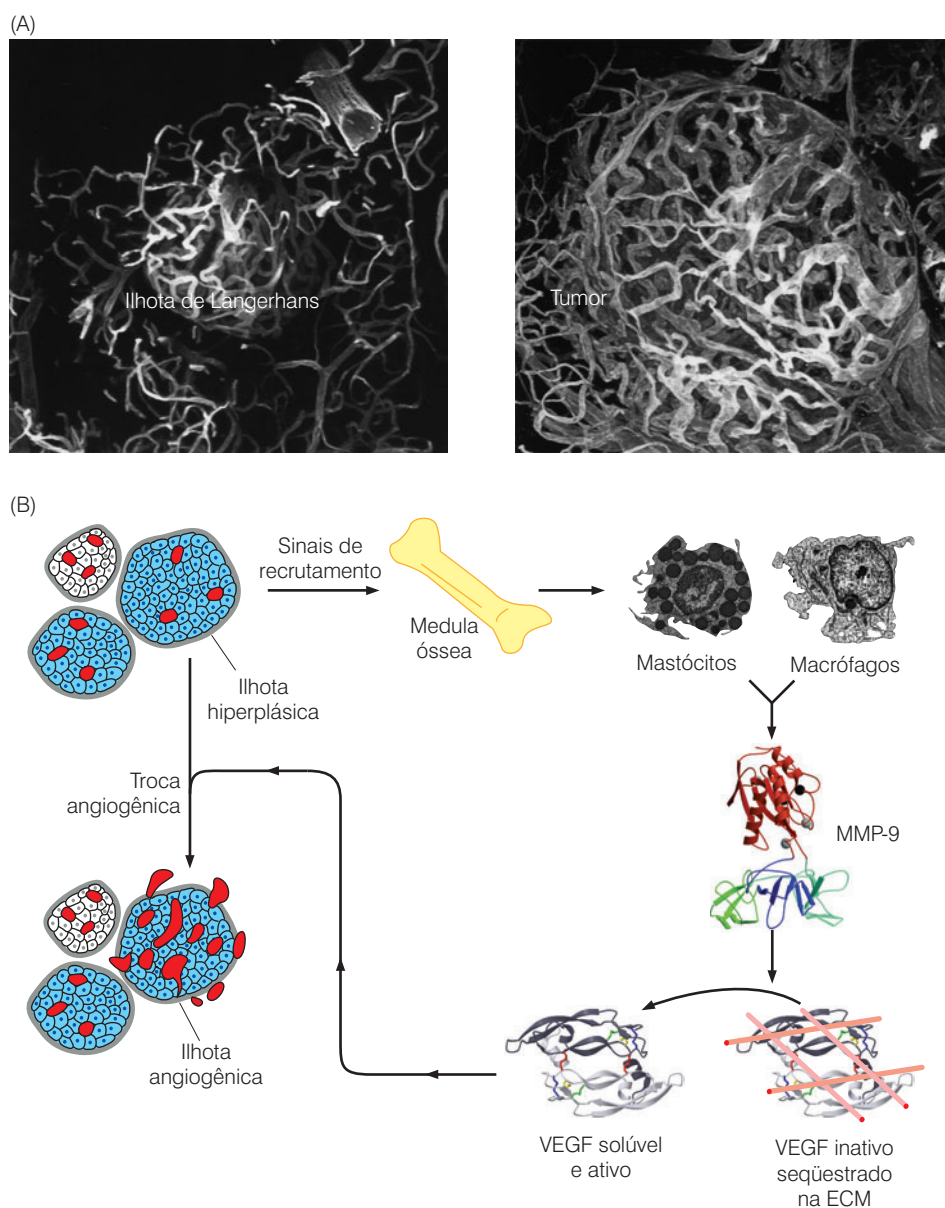


Tabela 13.2 Fatores angiogênicos importantes

Nome	Peso molecular (kD)
GF Endotelial vascular (VEGF)	40-45
Fator de crescimento de fibroblasto básico (bFGF)	18
Fator de crescimento de fibroblasto ácido (aFGF)	16,4
Angiogenina	14,1
Fator de crescimento de transformação- α (TGF- α)	5,5
Fator de crescimento de transformação- β (TGF- β)	25
Fator de necrose tumoral- α (TNF- α)	17
Fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF)	45
Fator estimulador de colônias de granulócitos	17
Fator de crescimento de placenta	25
Interleucina-8 (IL-8)	40
Fator de crescimento de hepatócitos (HGF)	92
Proliferina	35
Angiopoietina	70
Leptina	16

básico (aFGFs e bFGFs) e fator de crescimento de transformação α (TGF- α). Essa disponibilidade de múltiplos fatores angiogênicos (veja a Tabela 13.2), frequentemente observada em cânceres humanos avançados, complica o desenvolvimento de terapias do cancer antian- giogênicas, como veremos a seguir.

13.8 A troca angiogênica inicia um processo bastante complexo

A angiogênese começa no estroma que circunda os longos tumores de Rip-Tag muito antes que a membrana basal tenha sido destruída. Esse comportamento caracteriza muito dos tu-

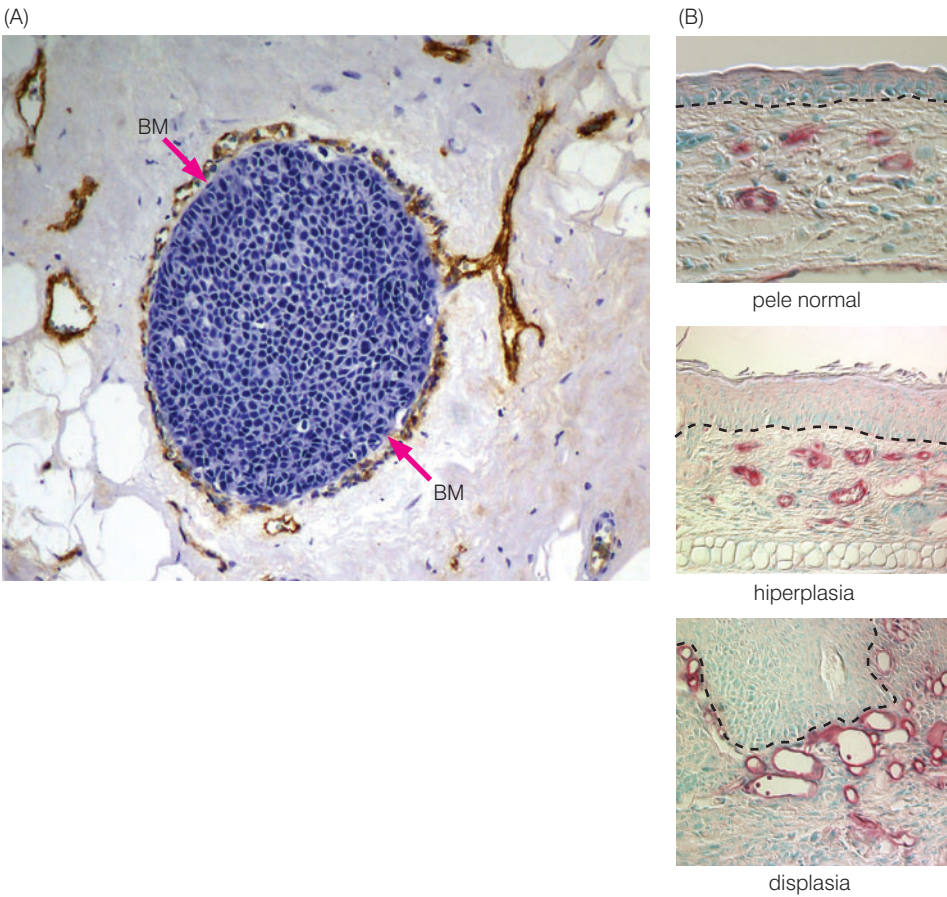


Figura 13.39 Sinalização através da membrana basal no início da progressão do tumor (A) Um carcinoma de ducto de mama humano *in situ* (DCIS) contém uma coleção de células de carcinoma (roxo) que não são invasivas e, portanto, a membrana basal (BM) que circunda elas e as separa do estroma mamário ainda não foi rompida. Como aparente, esses DCIS, apesar de tudo, têm sucedido na transmissão dos sinais angiogênicos através da BM para dentro dos estromas próximos, o que resulta no crescimento de pequenos vasos (marrom-escuro) que circundam a massa tumoral, mas não penetra o tumor por si só devido à integridade contínua da BM. (B) Nestes modelos de camundongos transgênicos da carcinogênese de pele, a região 16 do papilomavírus humano (HPV) é expressa sob controle de um promotor de genes queratina-14. No estágio hiperplásico recente da progressão de um tumor, as células de carcinoma não-invasivas no lado epitelial (*acima*) são capazes de transmitir sinais através da BM (*linha pontilhada*) que provocam angiogênese no lado do estroma, como evidenciado pelo aumento da densidade dos capilares (*vermelho*), detectado, nesse caso, por meio da sua disposição pelo antígeno CD31. Tecido displásico, no qual a BM (*linha pontilhada*) ainda não foi rompida, mostra até mais intensiva a angiogênese nas proximidades do estroma. (A, cortesia de A.L. Harris; B, de L.M. Coussens, W.W. Raymond, G. Berger set al., *Genes Dev.* 13:1382-1397, 1999.)

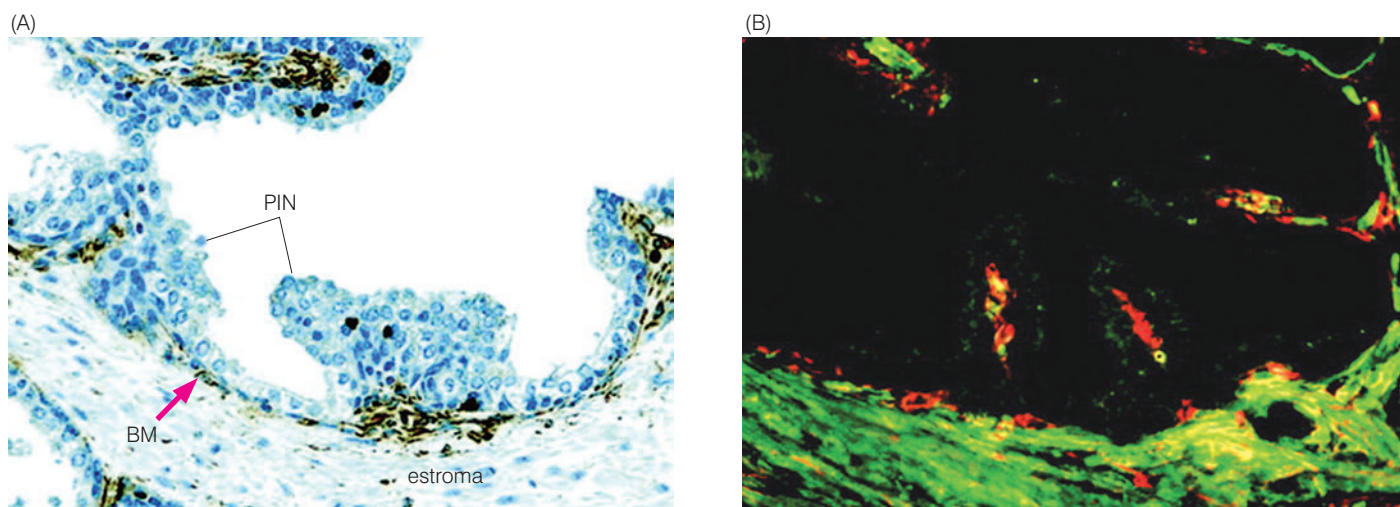
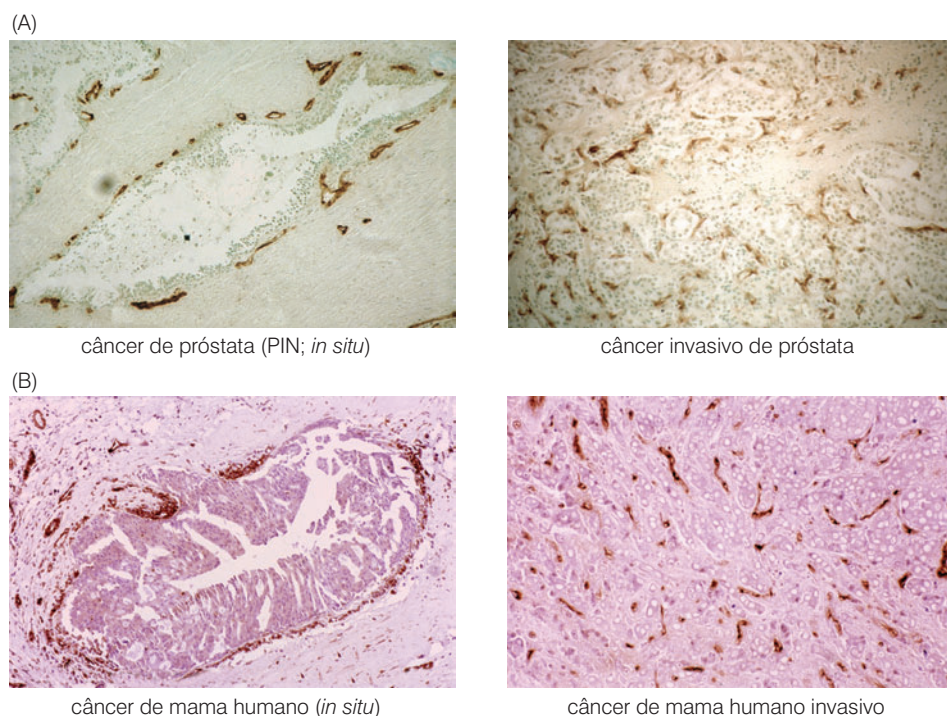


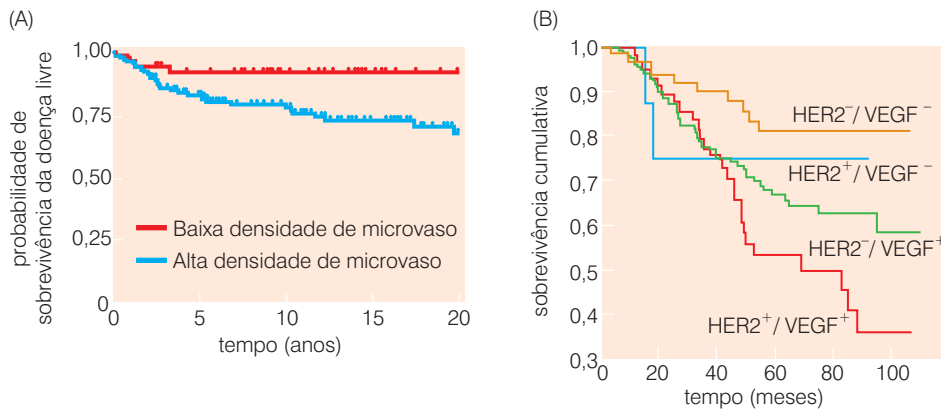
Figura 13.40 Recrutamento de miofibroblastos na porção estromal da membrana basal Miofibroblastos também estimulam angiogênese, em parte por meio da sua habilidade de recrutar células precursoras endoteliais (EPCs) ao tumor de estroma. (A) Em humanos, na neoplasia intra-epitelial de próstata – a contraparte do carcinoma de ducto *in situ* (DCIS) na mama – as células de carcinoma (núcleo azul-escuro) permanecem no lado epitelial da membrana basal (BM) ainda intacta, mesmo que estimulado o acúmulo de fibroblastos do estroma além BM, como indicado pela disposição de vimentina (marrom-escuro). (B) A

identificação de muitas dessas células do estroma, mais especificamente os miofibroblastos, é indicada pelo fato de elas poderem ser imunocoradas com ambos, um anticorpo de vimentina (vermelho) e actina de músculo liso α (verde); células co-expressando ambos os marcadores e, no entanto, identificadas como fibroblastos, são vistas em amarelo. Elas podem também ser identificadas como miofibroblastos por sua expressão de colágeno I (não-mostrado). (De J.Tuxhorn, G. E. Ayala, M.J. Smith et al., *Clin. Cancer Res* 8, 2912-2923, 2002.)

mores tanto em camundongos quanto em humanos (Figura 13.39). De certo modo, sinais angiogênicos são remetidos por células cancerosas benignas através de poros na membrana basal (BM) com o objetivo de encorajar angiogênese aumentada no lado do estroma dessa membrana. Outros sinais, ainda, transmitidos através da membrana basal, recrutam miofibroblastos para o estroma mais próximo (Figura 13.40). Conforme lemos anteriormente, esses miofibroblastos podem também ajudar a estimular a angiogênese.

Figura 13.41 Angiogênese antes e após a aquisição de invasividade A angiogênese tumoral é circunscrita enquanto o carcinoma humano permanece benigno. Entretanto, uma vez que se torna invasivo, a intensidade da angiogênese aumenta, levando a uma alta densidade de capilares (marrom) passando ao longo do seu caminho através dos tumores. (A) Os capilares que tocam uma lesão neoplásica intra-epitelial de próstata benigna (PIN) são muito menos do que aqueles em um carcinoma de próstata invasivo (direita). (B) Similarmente, aqueles em um ducto benigno de carcinoma de mama *in situ* (DCIS; esquerda) são muito menos do que aqueles em carcinoma de ducto invasivo (direita). (A, cortesia de J. Folkman; B, de N. Weidner, J.P. Semple, W.R. Welch e J. Folkman, *N. Engl. J. Med.* 324:1-8, 1991.)





Contudo, essa angiogênese recente é circunscrita, e está claro que angiogênese intensiva pode começar somente quando células cancerosas se tornam invasivas, penetram na membrana basal e adquirem contato íntimo direto com células do estroma (Figura 13.41). Isso sugere que invasividade tumoral e angiogênese intensiva são processos que frequentemente ocorrem acoplados. Estudaremos invasividade tumoral em mais detalhes no próximo capítulo.

Em muitos tipos de tumor humano, a densidade de capilares por campo microscópico aumenta concomitantemente com o aumento do grau de malignidade. Por exemplo, dentro de carcinomas de mama humanos que já cresceram em tamanho considerável, aqueles que foram arranjados para atrair densas redes de capilares para si são indicativos, em média, de um prognóstico pior do que aqueles que são pouco vascularizados (Figura 13.42 A). Além disso, pacientes com tumor de mama que expressam grandes quantidades de VEGF (além de HER2) também encontram péssimo diagnóstico e tratamento inicial (Figura 13.42 B). No geral, isso sugere que a troca angiogênica é apenas a primeira de muitas séries que impedem tumores de se tornarem progressivamente mais angiogênicos e, então, aumentarem a vascularização.

Essas correlações impressionantes são, na verdade, suscetíveis a duas interpretações alternativas. É possível que a vascularização intensa permita que células cancerosas cresçam mais agressivamente, levando aos resultados clínicos pobres. Alternativamente, intensa angiogênese é apenas um marcador de um fenótipo agressivo, mas não está casualmente envolvida no direcionamento da malignidade de alto grau. Dados clínicos disponíveis não permitem uma resolução clara entre essas alternativas.

Falamos da troca angiogênica como se pequenos números de células entre um tumor sofressem essa troca e proliferassem para, no final das contas, possuírem domínio entre a massa tumoral, transmitindo, assim, o fenótipo angiogênico ao tumor como um todo. De fato, a análise de células isoladas a partir de tumores humanos explanados indica boa heterogeneidade na força angiogênica de subpopulações diferentes de células cancerosas em um dado tumor, com certas células cancerosas sendo altamente angiogênicas, enquanto outras são muito pouco. Mesmo entre

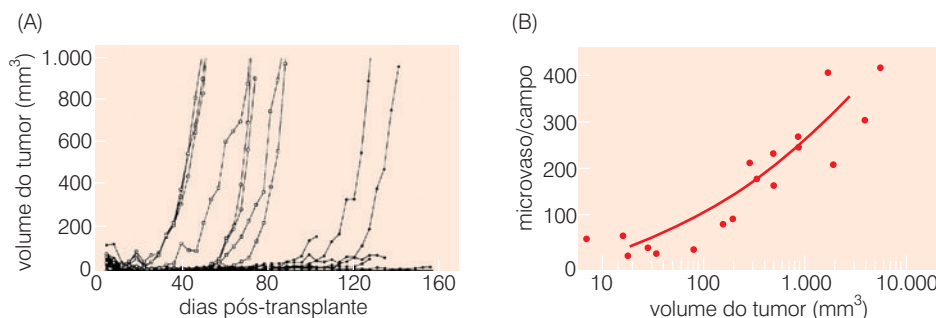
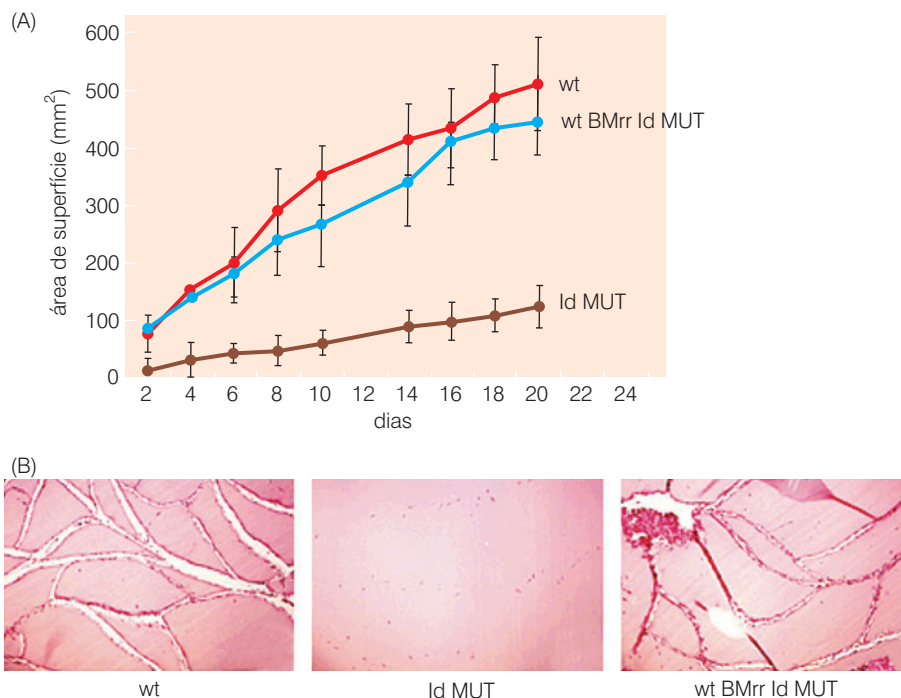


Figura 13.42 Resultado clínico e intensidade da angiogênese (A) Carcinomas de mama foram analisados pela densidade dos capilares (contagem de microvasos), que é determinada pelo número de capilares por campo microscópico. Este gráfico de Kaplan-Meier demonstra que aqueles pacientes nos quais os tumores tiveram um aumento na contagem de microvasos mais alto nos seus tumores (*curva azul*) tiveram acentuadamente menor probabilidade de sobreviverem livres de doenças nos 20 anos seguindo o diagnóstico inicial do que aqueles cujos tumores tiveram menor contagem de microvasos (*curva vermelha*). (B) Como indicado anteriormente (veja a Figura 4.6), pacientes com câncer de mama cujos tumores superexpressam HER2/Neu têm acentuadamente um prognóstico mais pobre do que aqueles que não o possuem. No grupo analisado aqui, todos os pacientes apresentaram células cancerosas metastáticas em um ou mais nódulos linfáticos drenando a mama. A diferença na sobrevivência é ainda mais dramática quando os níveis de VEGF produzidos por seus tumores são também medidos. Neste estudo clínico, relativamente pequeno, mais de 80% dos pacientes cujos tumores expressaram baixo nível basal de ambos, VEGF e HER2/Neu, estavam vivos oito anos após o diagnóstico. Ao contrário, apenas 35% dos pacientes cujos tumores expressaram elevados níveis de ambos, HER2/Neu e VEGF, continuavam vivos neste período. (A, de R. Heimann e S. Hellman. *J. Clin. Oncol.* 16:2686-2692, 1998; B, de G. E. Konecny, Y. G. Meng, M. Untch et al., *Clin. Cancer Res.* 10:1706-1716, 2004.)

Figura 13.43 Graus heterogêneos de vascularização em uma população de células tumorais (A) Quando uma população de células em uma linhagem celular de lipossarcoma humana foi submetida à clonagem de célula única (nos quais as células em cada resultado de clone celular derivam todas de um ancestral comum), as várias populações de células clonadas apresentaram muitas habilidades diferenciadas para formar tumores (*curva individual*) quando implantadas dentro de camundongos imunocomprometidos. (B) Quando os tumores resultantes são analisados por densidade dos microvasos (microvasos por campo microscópico) e volume do tumor, desenhado logaritmicamente aqui, se torna claro que elas têm muitas capacidades angiogênicas diferenciadas, e que a angiogênese é provavelmente determinante da taxa limitante da habilidade de formar tumores. (De E.G. Achilles, A. Fernandez, E.N. Allred et al., *J. Natl. Cancer Inst.* 93:1075-1081, 2001.)

Figura 13.44 Angiogênese defeituosa de tumor em camundongos $Id1^{+/-}Id3^{-/-}$. Camundongos mutantes (Id MUT), os quais não possuem três das quatro cópias do gene *Id* (e têm um genótipo $Id1^{+/-}Id3^{-/-}$), apresentam mobilização defeituosa das células precursoras endoteliais (EPCs) da medula óssea e, além disso, um recrutamento defeituoso de EPCs circulantes dentro dos tumores que eles podem carregar. (A) Camundongos tipo selvagem (wt) que possuem carcinoma pulmonar de Lewis (LLC) desenvolvem rapidamente tumores crescentes (*curva vermelha*), enquanto aqueles da cepa mutante (Id MUT) são incapazes de suportar crescimento vigoroso de tumor (*curva marrom*). Esse defeito é essencialmente revertido se a medula óssea (BM) de camundongos mutantes é eliminada por irradiação e substituída por uma medula óssea tipo selvagem transplantada (*curva azul*, wt BM Irr Id MUT), indicando que o recrutamento de células derivadas da medula óssea é defeituoso nos camundongos mutantes e é responsável pela incapacidade de crescimento de tumor. (B) Esse recrutamento defeituoso pode ser localizado pelo uso de tomadas de Matrigel (um material da matriz extracelular) que foram impregnadas com VEGF e então implantadas subcutaneamente. Tais tomadas são capazes de recrutar vascularização nova quando implantadas em camundongos tipo selvagem (*esquerda*), mas não em camundongos mutantes (*centro*). Entretanto, se os camundongos mutantes receberem um enxerto de células da medula óssea tipo selvagem, o defeito é curado, e a angiogênese dentro dessas tomadas torna-se comparável àquelas vistas em camundongos tipo selvagem (*direita*). (De D. Lynden, K. Hattori, S. Dias et al., *Nat. Med.* 7:1194-1201, 2001.)



linhagens celulares tumorais, populações individuais de células clonadas mostram um poder angiogênico muito diferenciado quando enxertados *in vivo* (Figura 13.43). Isso já introduz outra idéia: que em uma massa tumoral, depois de pular da troca angiogênica, as células cancerosas fracamente angiogênicas contam com a ajuda dos seus amigos – seus vizinhos fortemente angiogênicos – com o objetivo de adquirir vascularização adequada.

A troca angiogênica pode ter efeitos que se estendem muito além das mediações vizinhas do tumor. Primeiro, os vasos sanguíneos associados ao tumor que são formados podem ser gerados diretamente a partir de vasos existentes em tecido normal adjacente. Nesse estágio, é provável que as células endoteliais que formam esses novos capilares apareçam por meio da proliferação de precursores de células endoteliais que residem nesses vasos já formados. Entretanto, como a progressão do tumor, nova vascularização é provavelmente baseada no recrutamento de células precursoras endoteliais (EPCs) que se originam na medula e viajam pela circulação até a massa tumoral.

VEGF liberado dentro da circulação por um tumor estimula a produção de EPCs na medula óssea e ajuda a atrair EPCs para a massa tumoral. Como descrito anteriormente (Seção 13.4), fator 1 derivado de estroma (SDF-1, também chamado CXCL12), o qual é liberado por miofibroblastos do estroma, pode também ajudar nesse recrutamento. Uma vez que chegam à massa tumoral, os EPCs são induzidos a diferenciarem-se em células endoteliais funcionais e construir a vascularização associada ao tumor. Análises detalhadas mostraram que a proporção de células endoteliais derivadas da circulação de EPCs (*versus* aquelas que se desenvolvem a partir dos capilares ao redor) variam muito de um tipo de tumor para outro.

Essas dinâmicas de recrutamento de EPC são dramaticamente ilustradas pelo comportamento de camundongos em que faltam uma cópia do gene *Id1* e ambas as cópias do gene *Id3*. Lembre que esses genes *Id* codificam fatores de transcrição regulando a diferenciação de uma variedade de tipos celulares (Seção 8.11). Muitos desses camundongos mutantes sobrevivem até a fase adulta e apresentam um fenótipo muito peculiar: eles são defeituosos em neoangiogênese e não permitirão que inúmeros tipos de tumores enxertados cresçam (Figura 13.44A).

O defeito nesses camundongos $Id1^{+/-}Id3^{-/-}$ pode ser curados por transplante de células-tronco tipo selvagem dentro de sua medula óssea (veja a Figura 13.44A). Alternativamente, o grupo de células-tronco da medula óssea cuja produção em geral é estimulada por altos níveis de

VEGF circulante pode ser colhido de um camundongo tipo selvagem e transplantado dentro da medula óssea de camundongos *Id1^{+/-}Id3^{-/-}*. Esses camundongos logo gerarão grandes números de células precursoras endoteliais (EPCs) em sua circulação e, seguindo a implantação de células cancerosas, desenvolverão tumores de crescimento rápido. Juntas, tais informações indicam que esses tumores contam com VEGF para mobilizar EPCs a partir da medula óssea (Figura 13.44B) e para recrutar as células circulantes resultantes dentro do estroma tumoral. Esses achados, assim como outros demonstrando recrutamento de precursores de miofibroblastos dentro do estroma tumoral (Barra lateral 13.3), mostram que tumores primários podem estender seu alcance no corpo muito antes de entrarem em metástase.

13.9 A angiogênese é normalmente suprimida por inibidores fisiológicos

Em processos fisiológicos afinados, as ações de efetores positivos devem ser contrabalançadas por reguladores negativos. Lemos muito sobre os efetores positivos de angiogênese, tal como VEGF e bFGF; porém, seus antagonistas permaneceram nos bastidores até agora. Eles são tão interessantes e importantes quanto os fatores angiogênicos cujas ações eles antagonizam.

Durante o processo de cura de ferimentos, por exemplo, a enorme quantidade de angiogênese que é requerida para reparar o sítio da lesão deve ser desligada, uma vez que capilares formados recentemente alcançaram a densidade suficiente para suportar a função tecidual normal. Esse desligamento é ativado, pelo menos em parte, pela supressão da formação do fator de transcrição HIF-1. Sua formação é induzida sob condições de hipóxia, sendo revertida uma vez que a oxigenação normal no local da lesão tenha sido restabelecida (veja a Seção 7.12).

Além disso, diversos componentes da matriz extracelular são usados pelos tecidos para bloquear ativamente a angiogênese excessiva (Tabela 13.3). O componente melhor caracterizado é a proteína trombospondina-1 (Tsp-1), a qual é secretada por muitos tipos celulares para dentro do espaço extracelular circundante, em que forma homotrímeros e desempenha diversas funções distintas. Mais importante para nossa discussão, Tsp-1 associa-se a um receptor (chamado CD36) que é apresentado nas superfícies de células endoteliais e interrompe a proliferação destas. Além disso, pesquisas indicam que o tratamento de células endoteliais com Tsp-1 faz com que elas liberem o ligante Fas (FasL), a proteína sinalizadora pró-apoptótica que age ligando-se ao receptor de morte Fas. Lembre que, esta última, uma vez ligada a seu ligante, ativa uma cascata de caspase intracelular que desencadeia a apoptose (Seção 9.14). Portanto, uma vez que Tsp-1 faz com que células endoteliais liberem FasL, este pode agir de forma autócrina para desencadear a morte de tais células quando elas também apresentam o receptor Fas.

De maneira interessante, o receptor Fas é apresentado em células endoteliais que estão ativamente se proliferando ou tenham recentemente gerado proliferação, mas essa apresentação é suprimida uma vez que tais células tenham formado capilares maduros e recuado para quiescência (Figura 13.45 A). Isso parece explicar um grande aspecto intrigante do comportamento de Tsp-1: ele inibe seletivamente e causa regressão de capilares recentemente formados e crescentes, mas tem pouco efeito nos já formados, capilares maduros. De fato, diversos outros fatores naturais antiangiogênicos também parecem exibir tal seletividade. As ações desses outros agentes antiangiogênicos parecem, mais uma vez, depender sobretudo da ativação da cascata de caspases pró-apoptóticas em células endoteliais, já que compostos que inibem a enzima caspase também protegem as células endoteliais a partir do efeito antiangiogênico de Tsp-1 e outros bloqueadores naturais da angiogênese.

A transcrição do gene Tsp-1 é muito induzida pela p53, ostensivamente como parte de resposta de emergência mediada por p53 que leva a um desligamento generalizado de proliferação celular e crescimento de tecido. Contrariamente, a perda da função da p53, que é vista na maioria de todos os tumores humanos (Capítulo 9), leva a um decréscimo substancial dos níveis de Tsp-1. Isso permite a indução da angiogênese por células que normalmente seriam impedidas de tal ação pelas altas concentrações de Tsp-1 em matriz extracelular circundante.

Tabela 13.3 Inibidores endógenos da angiogênese

Inibidor	Descrição
A. Derivados de matriz extracelular	
Arresten	Fragmento de cadeia α_1 de colágeno tipo IV membrana basal vascular
Canstatina	Fragmento de cadeia α_2 de colágeno tipo IV de membrana basal vascular
EFC-XV	fragmento de colágeno tipo XV
Endorrepelina	fragmento de perlecano
Endostatina	fragmento de colágeno tipo XVIII
Anastelina	fragmento de fibronectina
Fibulina	fragmento de proteína de membrana basal
Trombospondina tipo 1 e 2	glicoproteínas ECM
Tumstatina	fragmento de cadeia α_3 de colágeno tipo IV
Condromodulina-I	componente de cartilagem EMC
Troponina I	componente de cartilagem EMC
B. não-derivados da matriz	
<i>Fatores de crescimento e citocinas</i>	
Interferon- α (INF- α)	Citocina
Interleucinas (IL-1 β , -12, -18)	Citocina
Pigmento de fator derivado de epitélio (PEDF)	Fator de crescimento
Fator plaquetário-4	liberado por plaquetas durante a degranulação
<i>Outros tipos</i>	
Angiostatina	fragmento de plasminogênio
Antitrombina III	fragmento de antitrombina III
2-Metoxiestradiol	metabólito endógeno de estradiol
PEX	fragmento de MMP-2
Plasminogênio <i>kringle</i> 5	fragmento de angiostatina
Fragmento de prolactina	fragmento de clivagem específica
Protrombina <i>kringle</i> 2	fragmento de protrombina
sFlt-1	forma solúvel de VEGF-R1 (=Flt-1)
TIMP-2	inibidor de metaloproteinase - 2
TrpRS	fragmento de triptofano yl-tRNA Sintetase
Vasostatina	Fragmento de calreticulina

Adaptada de P. Nyberg, L. Xie e R. Kalluri, *Cancer Res.* 65:3967-3979, 2005.

A oncoproteína Ras, atuando por meio de uma cascata complexa de sinalização, atua de forma oposta, já que causa a repressão da expressão do gene TSP1. A ausência resultante de níveis significativos de Tsp-1 pode também contribuir substancialmente para o elevado poder angiogênico de células de *ras* transformadas em comparação com seus vizinhos normais. Em um estudo de melanomas emergentes em camundongos transgênicos, a expressão do oncogene H-*ras*, o qual foi usado para iniciar esses tumores, foi reprimido após os tumores terem crescido até tamanho considerável. Tais tumores colabaram logo após isso, e esse colapso foi diretamente caracterizado pela sua perda de vascularização funcional, a qual começou a se desintegrar dentro de seis horas após a perda de função da Ras (Figura 13.45B). A rápida entrada observada em apoptose de células endoteliais que formam a vascularização do tumor precedeu qualquer declínio nos níveis de VEGF (os quais promoveram os sinais de sobrevivência para as células endoteliais). Enquanto não demonstrado nesse experimento diretamente, parece que essa apoptose derivada da reexpressão rápida de Tsp-1 é que segue próxima na direção do fechamento da Ras.

Tsp-1 é certamente um governante majoritário da angiogênese, mas, como dito anteriormente, é apenas um de uma grande coorte de inibidores da angiogênese que são encontrados nos espaços entre as células (veja a Tabela 13.3). A existência de diversas outras moléculas antiangiogênicas foi primeiro sugerida pelas observações do comportamento de certos tumores primários e suas metástases derivadas. Em alguns modelos de tumorigênese em camundongo, metástases foram encontradas permanecendo pequenas, enquanto o tumor primário que elas geraram continuou crescendo. Entretanto, no momento em que o tumor primário foi cirurgicamente removido, a metástase começou a crescer vigorosamente. Esse comportamento também foi relatado por cirurgiões de câncer, os quais observaram que após remoção

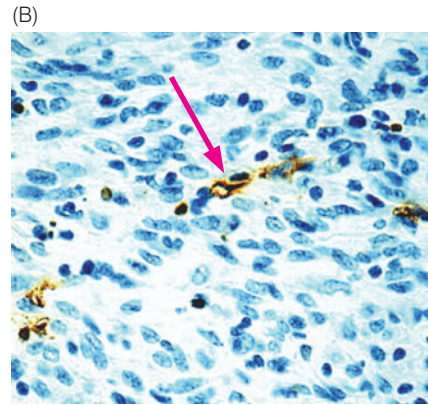
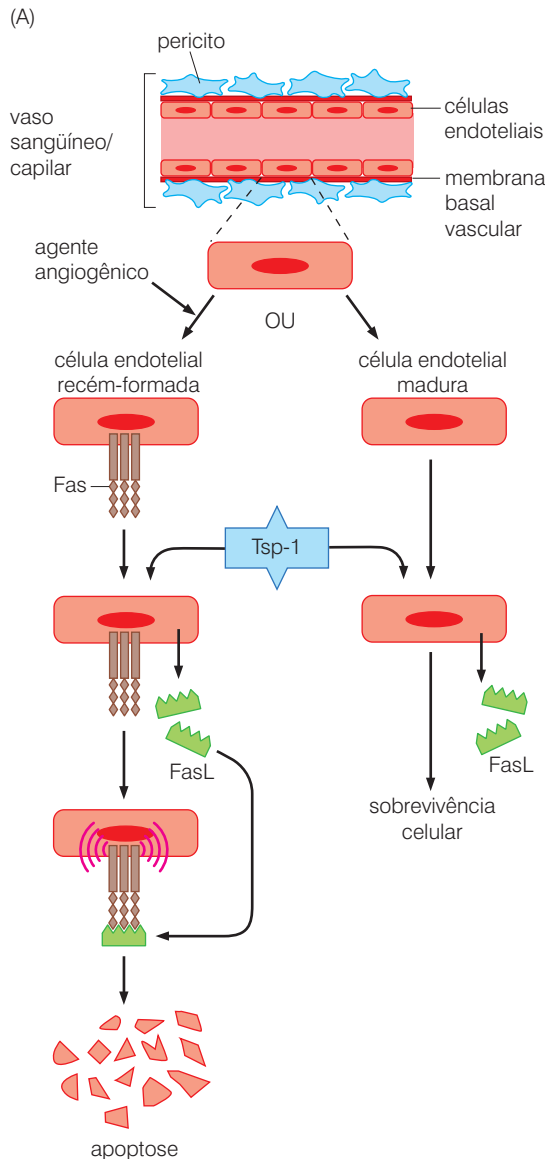


Figura 13.45 Trombospondina, sobrevivência de células endoteliais e tumorogênese (A) A estimulação de células endoteliais inertes com agentes angiogênicos, tais como VEGF ou bFGF, criam células endoteliais ativas em crescimento (*ramo da esquerda*), que, em seguida, expressam o receptor de morte de Fas na sua superfície. Tratamento subsequente de células endoteliais recém-formadas e maduras com Tsp-1 (*azul*) faz com que ambos os grupos de células secretem FasL (*verde*), o ligante do Fas. Entretanto, devido a apenas células endoteliais ativadas disporem de receptor Fas, este é preferencialmente induzido a entrar em apoptose por Tsp-1. Isso parece explicar por que Tsp-1 pode bloquear novas angiogêneses, mas tem efeitos relativamente mínimos na vascularização recém-construída, em que células endoteliais são raramente envolvidas no crescimento ativo. (B) A perda da expressão do oncogene *ras* pode levar ao aumento rápido na expressão Tsp-1. Isso pode explicar porque nos modelos de camundongos transgênicos com desenvolvimento de melanoma o desligamento da expressão do oncogene *ras* em tumores já formados leva ao rápido colapso da vascularização associada ao tumor e à regressão do tumor. Aqui, ensaio de TUNEL para apoptose revela células endoteliais apoptóticas dentro de um capilar de um melanoma regressivo. (A, adaptada de O.V. Volpert, T. Zaichuk, W. Zhou et al., *Nat. Med.* 8:349-357, 2002; B, de L.Chin, A. Tam, J. Pomerantz et al., *Nature* 400:468-472, 1999.)

cirúrgica bem-sucedida de um tumor primário, números substanciais de metástases puderam repentinamente brotar e fluorescer, ocorrendo em um período de meses.

Tais observações sugeriram que algum tipo de substância inibitória liberada pelo tumor primário agiu, via circulação, para suprimir a proliferação de ninho de células metastáticas distantes. Mais especificamente, esses fatores inibitórios, independentemente da sua natureza, pareceram bloquear a angiogênese nesses crescimentos secundários, os quais falharam na expansão para um diâmetro de mais que inúmeras dezenas de um milímetro. Uma vez que o tumor primário foi excisado, o(s) fator(es) inibitório(s) hipotético(s) desapareceu da circulação, removendo algum obstáculo do crescimento de metástases já disseminadas.

O isolamento subsequente desses fatores circulantes, inicialmente a partir da urina de animais com tumor, rendeu o intensivo estudo de moléculas de angiostatina e endostatina. A determinação da sequência de aminoácidos dessas duas proteínas indicou que elas surgem como produtos clivados de proteínas familiares da matriz extracelular (ECM) ou plasma. Com o passar do tempo, ainda outras substâncias antiangiogênicas foram isoladas (veja a

Tabela 13.3), muitas das quais são também formadas por proteólise de proteínas extracelulares. Juntas, essas descobertas sugerem como a angiogênese procede em tecidos normais durante desenvolvimento e injúria, processo que é eventualmente encurtado pelo acúmulo de fragmentos de proteína antiangiogênica no espaço extracelular. Essas substâncias antiangiogênicas ocorrendo naturalmente podem então ser descritas como componentes importantes nos ciclos de *feedback* negativo, operando para assegurar que a vascularização excessiva de um tecido não ocorra.

Em mais detalhes, a membrana basal especializada circundando capilares é a fonte de várias proteínas que têm potente poder antiangiogênico. A clivagem proteolítica do colágeno XVIII gera o fragmento C-terminal de 20kD que foi descoberto como endostatina. Ainda outro, tumstatina, deriva da clivagem de uma das cadeias de colágeno IV (que constitui metade da membrana basal do capilar), gerando um fragmento de 28kD. A clivagem de colágeno IV gera também outro fragmento antiangiogênico chamado *arresten*. E a clivagem do plasminogênio (o precursor de uma protease plasmina envolvida na ativação da coagulação) gera o fragmento interno de 38kD conhecido como angiostatina.

Outra classe importante de proteínas naturais antiangiogênicas funciona como antagonista das metaloproteinases da matriz (MMPs). VEGF estimula a produção localizada de MMPs 1 a 4, que permite o alongamento dos capilares para penetrar a matriz extracelular entre as células. Uma classe de proteínas secretadas, chamadas de inibidores de tecido de metaloproteinases (TIMPs), podem impedir esse alongamento pelo bloqueio da ação destas e de outras MMPs. Por exemplo, forçando a expressão ectópica de TIMP-2 em células tumorais, pesquisadores bloquearam o poder angiogênico e depois tumorogênico dessas células. Entretanto, o mecanismo preciso pelo qual TIMPs bloqueiam a angiogênese permanece não claramente resolvido (Barra lateral 13.8).

De forma argumentável, o inibidor natural de angiogênese mais bizarro é uma forma variante de triptofanil-tRNA sintetase. Essa enzima é normalmente responsável por carregar o tRNA do aminoácido triptofano e, no entanto, é um dos componentes principais do aparato de síntese protéica. Entretanto, uma versão de *splicing* alternativo de mRNA que codifica essa enzima leva a uma forma truncada de tal proteína, chamada mini TrpRS, que é secretada pelas células; essa produção é induzida por tratamento com interferon das células. Essa proteína, que pode especificamente enganar a apoptose de células endoteliais, é um exemplo do uso oportunista, pela evolução, de qualquer substância para solução de certos problemas biológicos.

Quando integradas, tais observações muito diferentes sobre reguladores fisiológicos de angiogênese reforçam a idéia, citada anteriormente, de que angiogênese não é um estado binário – nem ligado nem desligado. Ao contrário, diferentes tipos de células tumorais adquirem muito ou pouco poder angiogênico, e, mesmo em um tumor específico, as células tumorais são parecidas, apresentando diferentes habilidades para atrair vascularização. Tal comportamento é explicado por um esquema (Figura 13.46) no qual o balanço entre fatores pró e antiangiogênicos determinam se neoangiogênese irá proceder e, se proceder, como regiões intensas de um tumor se tornarão vascularizadas.

13.10 Certas terapias antiangiogênicas sustentam boas promessas para o tratamento do câncer

Quanto mais complexo um sistema se torna, mais vulnerável é para os vários tipos de ruptura. O processo de angiogênese, conforme descrito, claramente se encaixa na classe de sistemas altamente complexos, como mostrado por sua dependência em múltiplos tipos celulares e moléculas de sinalização. De fato, enquanto descobrimos importantes fatores angiogênicos, existem pelo menos uma dúzia envolvidos na regulação de várias etapas de morfogênese vascular (veja a Tabela 13.2).

Barra lateral 13.8 TIMPs suprimem a angiogênese de várias maneiras Evidências acumuladas indicam que TIMPs podem agir em outros alvos moleculares além das MMPs. Por exemplo, VEGF e receptores do fator de crescimento de fibroblastos (FGF), os quais são requeridos para a resposta de células endoteliais para esses dois fatores de crescimento angiogênico críticos, são também inibidos por TIMP-2. Evidências indicam que esses receptores antagonistas procedem através de uma rota indireta completa: TIMP-2 se liga a uma integrina de superfície celular e, após, atua via sua cauda citoplasmática, ativa uma fosfatase intracelular que progride à desfosforilação e então desliga a sinalização pelos receptores VEGF e FGF. Essas atividades antineoplásicas diversas de TIMPs fazem delas agentes atrativos para desenvolvimento de terapêuticos anticâncer. Entretanto, mesmo com numerosos projetos de pesquisas em desenvolvimento, nenhum dos TIMPs ou análogos de TIMP mostrou ser um antagonista viável de desenvolvimento de tumor quando usado na clínica.

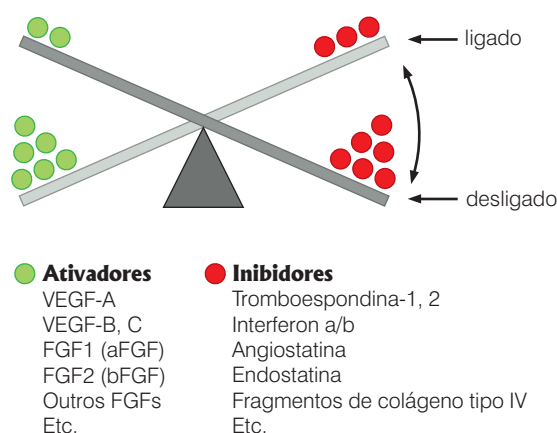


Figura 13.46 Balanceando a troca angiogênica Este diagrama apresenta os maiores reguladores fisiológicos que trabalham para promover ou inibir a angiogênese dentro de tecidos e indica que esse é o balanço entre esses dois grupos de reguladores que determinam se a angiogênese procede ou não. Enquanto a troca angiogênica é descrita aqui essencialmente como uma decisão binária ligado-desligado, de fato a vascularização que cresce dentro de uma massa tumoral após a troca ter sido ativada apresenta várias graduações de desenvolvimento. (De D. Hanahan e J. Folkman, *Cell* 86:353-364, 1996, e cortesia de D. Hanahan.)

Para aqueles pesquisadores com interesse no desenvolvimento de novos tipos de terapias anticâncer, essa complexidade oferece múltiplos alvos para intervenção. Em particular, terapias altamente almejadas podem ser desenvolvidas para inibir vários tipos celulares que participam da angiogênese, assim como os múltiplos canais de sinalização pelos quais eles se intercomunicam. Já que tumores dependem absolutamente da angiogênese para crescerem acima de certo tamanho ($\sim 0,2$ mm de diâmetro), qualquer sucesso no bloqueio da angiogênese ou na não produção de produtos da angiogênese deveria representar uma estratégia altamente efetiva para tratamento do câncer. Tumores microscópicos deveriam ser impedidos de atingir um crescimento maior, enquanto grandes tumores deveriam sofrer colapso uma vez que seu fornecimento sanguíneo já estabelecido tivesse se desintegrado.

Em princípio, terapias antiangiogênicas têm uma vantagem maior do que aquelas direcionadas de células neoplásicas entre tumores. Como iremos aprender no Capítulo 16, uma das grandes frustrações de drogas anticâncer desenvolvidas veio do fato de que, mais cedo ou mais tarde, tumores que responderam inicialmente a um tratamento de drogas irão recair e se tornar **refratários** (resistentes) aos tratamentos seguintes pela droga. Quase sempre, tais recidivas podem ser traçadas pelo surgimento das variantes resistentes às drogas entre populações de células tumorais; essas variantes surgem com uma frequência quase previsível e progridem para proliferar e regenerar agressivamente massas tumorais em crescimento. O surgimento dessas variantes resistentes a drogas parece ser uma das consequências dos genomas altamente instáveis de células cancerosas (veja as Seções 12.11 e 12.12) e de sua resultante habilidade para gerar mutantes em alta frequência.

Muitas terapias antiangiogênicas, em contraste absoluto, estão direcionadas a matar células geneticamente *normais* que foram recrutadas para dentro de massas tumorais e escolhidas pelas células tumorais para fazer sua ligação. Há várias razões para acreditar que células endoteliais de tumores possuem genomas normais e estáveis e, portanto, são fenotipicamente estáveis. Então, terapias de drogas direcionadas contra essas células não são, provavelmente, selecionadas para crescimento de variantes resistentes a droga, e tumores não deveriam, em teoria, se tornarem refratários para terapias de drogas antiangiogênicas (veja, entretanto, a Barra lateral 13.9).

Esse interesse no tratamento de células endoteliais associadas ao tumor é favorecido pela biologia peculiar de tais células. Elas são continuamente formadas e perdidas entre a massa tumoral, com tempo de vida tão curto quanto uma semana, enquanto suas contrapartes que delineiam vasos sanguíneos normais em qualquer lugar do corpo raramente se dividem e têm tempo de vida em torno de centenas de dias, algumas chegando a sete anos. Células do ciclo celular (p. ex., células em direção ao ciclo celular ativo) são, quase sempre, muito mais sensíveis à morte induzida por droga do que as células quiescentes. Por essa razão, terapias citotóxicas direcionadas contra células endoteliais deveriam ter efeitos drásticos na vascularização associada ao tumor, mas deixando vasos sanguíneos localizados em qualquer outro lugar do corpo ilesos (menos para a cavidade citada na Barra lateral 13.9).

Barra lateral 13.9 Tumores podem enganar mesmo as melhores terapias antiangiogênicas Muitos dos atrativos das terapias antiangiogênicas vêm da probabilidade de que células-alvo, especialmente células endoteliais, não são razoáveis para gerar variantes resistentes às drogas. A complexidade de sinalização heterotípica pode, entretanto, permitir aos tumores iludir mesmo a mais inteligente terapia antiangiogênica. Imagine, por exemplo, que planejamos uma estratégia para bloquear a sinalização de VEGF que é muito crítica para a formação de novos vasos em um tumor e para a sua manutenção subsequente (desde que VEGF seja requerido para a sobrevivência de células endoteliais). Um tumor tratado dessa maneira deveria rapidamente ter um colapso, já que seu capilar fixado se desintegrará. De fato, tal resposta somente foi observada em camundongos Rip-Tag que desenvolveram tumores de ilhotas pancreáticas (veja a figura 13.37). Quando tratados com um anticorpo anti-VEGF-R2, seus tumores regrediram mais do que 50%. Entretanto, as células tumorais residuais sobreviventes responderam por geração de variantes que adquiriram habilidade para produzir níveis elevados de fatores angiogênicos. Esses fatores de crescimento então suplementaram VEGF como o principal condutor de sinais a partir dos tumores de ilhota para células endoteliais e progrediram na ativação da regeneração da vascularização e, ao contrário, renasceram de um vigoroso tumor em crescimento. De acordo com isso, estratégias antiangiogênicas verdadeiramente efetivas irão requerer a inibição de múltiplas rotas angiogênicas.

Terapias antiangiogênicas também são atrativas por causa de seu seletivo potencial para matar as células endoteliais em proliferação dentro dos tumores, já que muitos vasos sanguíneos nesses crescimentos parecem estar em estado constante de formação e colapso, e são então suscetíveis a drogas citotóxicas que podem deixar as células endoteliais quiescentes em tecidos normais intocáveis. Por exemplo, dramaticamente contrastando, estados de crescimento normal e vasos sanguíneos associados a tumor podem ser vistos em muitos modelos de cânceres de camundongos, nos quais tumores enxertados expandem rapidamente. Entretanto, é possível que muitos dos vasos dos tumores de crescimento lento em humanos tenham existido por anos e então tenham tido tempo suficiente para consolidar-se e amadurecer dentro de vasos robustos e bem-estruturados nos quais células endoteliais trocam lentamente. Esses vasos associados ao tumor podem ser resistentes a drogas antiangiogênicas como os vasos sanguíneos normais em outro lugar do corpo.

Iremos aprender em maior detalhe os princípios da terapia anticâncer mais tarde, no Capítulo 16, mas teremos, neste capítulo, a oportunidade de descrever os detalhes de terapias emergentes que são direcionadas especificamente contra a vascularização associada ao tumor. Alguns desses primeiros esforços nessa área vieram de experimentos nos quais inibidores naturais antiangiogênicos mencionados anteriormente foram usados para tratar tumores nascidos em camundongos.

Já que esses agentes, assim como angiostatina e endostatina, são nativos do corpo, eles têm a vantagem de serem razoavelmente bem-tolerados sem os efeitos colaterais tóxicos. Eles não têm efeito virtual na proliferação *in vitro* de uma variedade de células e, ao contrário, são biologicamente ativos somente em células endoteliais que estão ativamente participando da neoangiogênese *in vivo*. Além disso, tais proteínas podem persistir por algum tempo na circulação, aumentando a exposição da vascularização tumoral aos seus efeitos antiangiogênicos. Um lado negativo, da sua produção em grande quantidade, como as outras proteínas, é o custo e desafio, e seu mecanismo preciso de ação tem sido elusivo.

Ambas, angiostatina e endostatina, têm apenas efeitos modestos no bloqueio de trocas angiogênicas no pâncreas de camundongos Rip-Tag (Seção 13.7). Mas, quando aplicada em pequenos tumores já vascularizados, a endostatina reduz mais que 80% do seu crescimento subsequente, enquanto a angiostatina reduz seu tamanho em 50%. Quando tumores grandes, bem-estabelecidos, foram tratados com um dos dois agentes, efeitos relativamente pequenos foram vistos, mas, quando os dois foram introduzidos juntos, causaram uma redução de 75% da massa de tais tumores. O tratamento de camundongos com endostatina de longa duração influenciando tumores formados de uma linhagem celular de carcinoma de pulmão levou à regressão dos tumores. Esse sucesso deveria sugerir que a endostatina pode ser usada como uma terapia altamente efetiva na clínica oncológica. Entretanto, respostas como essas em camundongos são raramente previsíveis de eficiência similar na clínica oncológica. Algumas respostas dramáticas foram reportadas seguindo tratamento de endostatina em um pequeno número de pacientes tratados nos exames clínicos anteriores.

Ainda outra classe de antagonistas angiogênicos naturais (veja a Tabela 13.3) são os interferons, que são normalmente estudados no contexto de sua habilidade para modular as atividades de vários tipos celulares que operam no sistema imune. Interferon α e β provaram ser potentes supressores da síntese de fatores de crescimento de fibroblastos básico (bFGF) e de

interleucina-8 (IL-8), ambos os quais são fortes agentes angiogênicos. Além disso, a administração de interferon α provou ser útil causando a regressão de alguns hemangiomas (tumor de células endoteliais), assim como do sarcoma de Kaposi, os quais se originam de células endoteliais (possivelmente de células endoteliais formando os ductos linfáticos). Em ambos os casos, as regressões do tumor foram atribuídas aos efeitos antiangiogênicos do interferon.

Um experimento reportado em 1991 forneceu uma das mais recentes indicações para promessa de outro tipo de terapia antiangiogênica. Nesse trabalho, células cancerosas foram construídas para liberar um fator de crescimento de fibroblastos básico (bFGF), o qual aumentou muito sua tumorigênese em camundongos, simplesmente porque esse bFGF aumentou fortemente o poder angiogênico dessas células. O uso de anticorpos monoclonais que especificamente se ligam e neutralizam esses bFGF (mas não têm efeito sobre bFGF endógeno de camundongo) bloqueou a angiogenicidade dessas células tumorais e levou a uma redução dramática no volume do tumor. Dentro de dois anos, um experimento similar foi realizado com um anticorpo monoclonal de VEGF anti-humano. Isso rendeu no bloqueio da proliferação de duas linhagens de células de sarcoma humano assim como um glioblastoma em NUDE (imunocomprometido) de camundongo hospedeiro.

Uma versão moderna dessa terapia veio uma década mais tarde com o uso de um anticorpo monoclonal que se liga e neutraliza VEGF-A. Esse anticorpo, chamado de Avastina ou de bevacizumab, mostrou eficácia significativa em exames de larga escala. Por exemplo, pacientes com carcinoma de cólon metastático tratados com esse anticorpo e mais a quimioterapia (a droga 5-fluoracil) durante, em média, quatro meses a mais que pacientes tratados com apenas quimioterapia, e a adição de Avastina à quimioterapia convencional prolongada em pacientes vivos com carcinoma de pulmão de células não-pequenas (NSCLC) por cerca de dois meses. De forma similar, Avastina poderia retardar a progressão de carcinoma de células renais em pacientes, mas no final não tem efeito na sua sobrevivência de longo período. É plausível que efeitos sinérgicos de Avastina com droga quimioterápica convencional derivam diretamente da habilidade desses inibidores de VEGF-A para normalizar a vascularização associada ao tumor, facilitando, portanto, a entrega de drogas ao parênquima do tumor.

Alguns compostos antiangiogênicos sintéticos de baixo peso molecular foram descobertos ou desenvolvidos, os quais são direcionados contra vários alvos moleculares no programa angiogênico. O primeiro desses foi fumagilina, um composto antiangiogênico derivado de fungos, e seu derivado químico, TNP-470 (Tabela 13.4C). Esses dois compostos foram encontrados por inibir a proliferação de células endoteliais *in vitro* e *in vivo*; isso sugere que seus efeitos antiangiogênicos *in vivo* derivam da sua habilidade de impedir o crescimento de novos capilares, os quais dependem da proliferação de células endoteliais. De forma importante, TNP-470 não tem efeito na proliferação de células tumorais *in vitro*, mas bloqueia fortemente tumorigênese em camundongos. Por exemplo, essa droga reduz de 70 a 80% o tamanho de tumores de ilhotas pancreáticas em surgimento em camundongos Rip-tag. O mecanismo de ação de TNP-470 permanece obscuro, mas está sob investigação ativa. Isso comprovou a habilidade de inibir a enzima aminopeptidase-2 metionina em células endoteliais e um dia pode ajudar a explicar seus efeitos preferenciais nessas células, enquanto não tem quase nenhum efeito em outros tipos celulares cultivados.

Os estudos mais informativos de inibidores de angiogênese vieram do uso de inibidores sintéticos de receptores (veja a Tabela 13.4B) no modelo transgênico Rip-Tag de tumorigênese de ilhotas pancreáticas (veja a Seção 13.7). Dois tipos de compostos sintéticos de baixo peso molecular foram utilizados na tentativa de bloquear vários estágios de progressão tumoral de ilhotas. Uma dessas drogas é direcionada contra VEGF-R2, o qual é o receptor principal da angiogênese nesse modelo tumoral. Pela inibição de tirosina quinase desse receptor, o agente chamado SU5416 deveria mimetizar os efeitos da Avastina (anticorpo monoclonal anti-VEGF descrito anteriormente), ou seja, ambos deveriam ser capazes de interromper a sinalização de VEGF. Drogas de uma segunda classe,

Tabela 13.4 Inibidores da angiogênese e seus desenvolvimento e uso em exame clínica

Nome	Status	Respostas
A. Inibidores endógenos da angiogênese		
Endostatina	Testes clínicos	resposta dispersa
Interferon α e β	Efetivo no tratamento de hemangioblastoma	sarcoma de Kaposi; eficácia limitada contra outros tipos de tumores
B. Agentes que bloqueiam a sinalização de VEGF e VEGF-R		
Avastina anti-VEGF MoAb	Em testes clínicos	progressão atrasada 1-3 meses no pulmão; 3-4 meses no cólon
Inibidor SU5416 de VEGF-R2 (Flk-1)	Testes abandonados	toxicidade vascular grave
Inibidor ZD6474 de VEGF-R2	Testes clínicos	
CP547, 632 inibidor de VEGF-R2	Em teste	
C. Outras drogas diferentes		
Talidomida	Em testes	inibe angiogênese e bFGF e VEGF
Esterol de Esqualamina de fígado de tubarão	Em testes	forte atividade anti-angiogênica
Droga antiinflamatória Celecoxib	Em testes	efeitos antineoplásicos múltiplos
ZD6126	Em testes	antagonista de tubulina em endoteliais do citoesqueleto
Fumagilina e TNP-470	Em testes, crescimento tumoral lento	antagonista de aminopeptidase de metionina em células endoteliais
D. Inibidores de colapso de ECM-inibidores de MMP		
Marimastat	Em testes clínicos	sem impedimento na progressão do tumor
Prinomastat	Em testes clínicos	sem demora na progressão do tumor
BMS275291	Em testes clínicos	
BAY12-9566	Em testes clínicos	
Neovastat (MMPI de cartilagem de tubarão)	Em testes clínicos	

assim como um agente chamado SU6668, são conduzidas primariamente contra a tirosina quinase do receptor de PDGF. Nossas discussões aqui sobre a função de PDGF no recrutamento de pericitos e células de musculatura lisa para o crescimento dos capilares (Barra lateral 13.1) indicam que essas células de “parede” são muito importantes para a consolidação e fortalecimento dos capilares recentemente formados.

SU5416, de agente anti-VEGF-R, foi capaz de bloquear 90% do estágio recente; ilhotas displásicas a partir da submissão da troca angiogênica, os mantiveram, portanto, em um tamanho pequeno e em um estado não-invasivo (Figura 13.47). Entretanto, SU5416 não tem efeito no estágio tardio, ou seja, tumores bem-estabelecidos continuaram a progressão apesar da sua presença igualmente em altas concentrações. Então, no estágio recente da angiogênese, a sinalização de VEGF desenvolve função importante, enquanto no tardio, esse processo parece se tornar ainda mais independente de VEGF.

O agente do receptor anti-PDGF, SU6668, tem um efeito muito mais fraco na prevenção de ilhotas displásicas a partir da submissão da troca angiogênica, reduzindo cerca de metade das ilhotas que o fizeram (veja a Figura 13.47C). Mas isso foi muito mais potente que a droga anti-VEGF-R no tratamento do estágio tardio, em tumores avançados, reduzindo seu tamanho pela metade e substancialmente reduzindo sua vascularização (Figura 13.47D). De forma importante, as únicas células que expressam PDGF-R no e perto desses tumores foram os pericitos associados ao capilar e relacionados às células da musculatura lisa (Figura 13.47B), indicando que essas células da parede foram os alvos da ação de SU6668. De fato, exame microscópico confirmou que SU6668 impediu a associação e o reforço dessas células com o tubo de capilar formado por células endoteliais. Juntos, esses experimentos mostraram que os passos iniciais da angiogênese poderiam progredir razoavelmente bem sem a função do receptor de PDGF, porém, mais tarde na progressão do tumor, a sinalização de PDGF e o envolvimento de células de parede se tornam muito importantes para angiogênese e crescimento dessa massa tumoral.

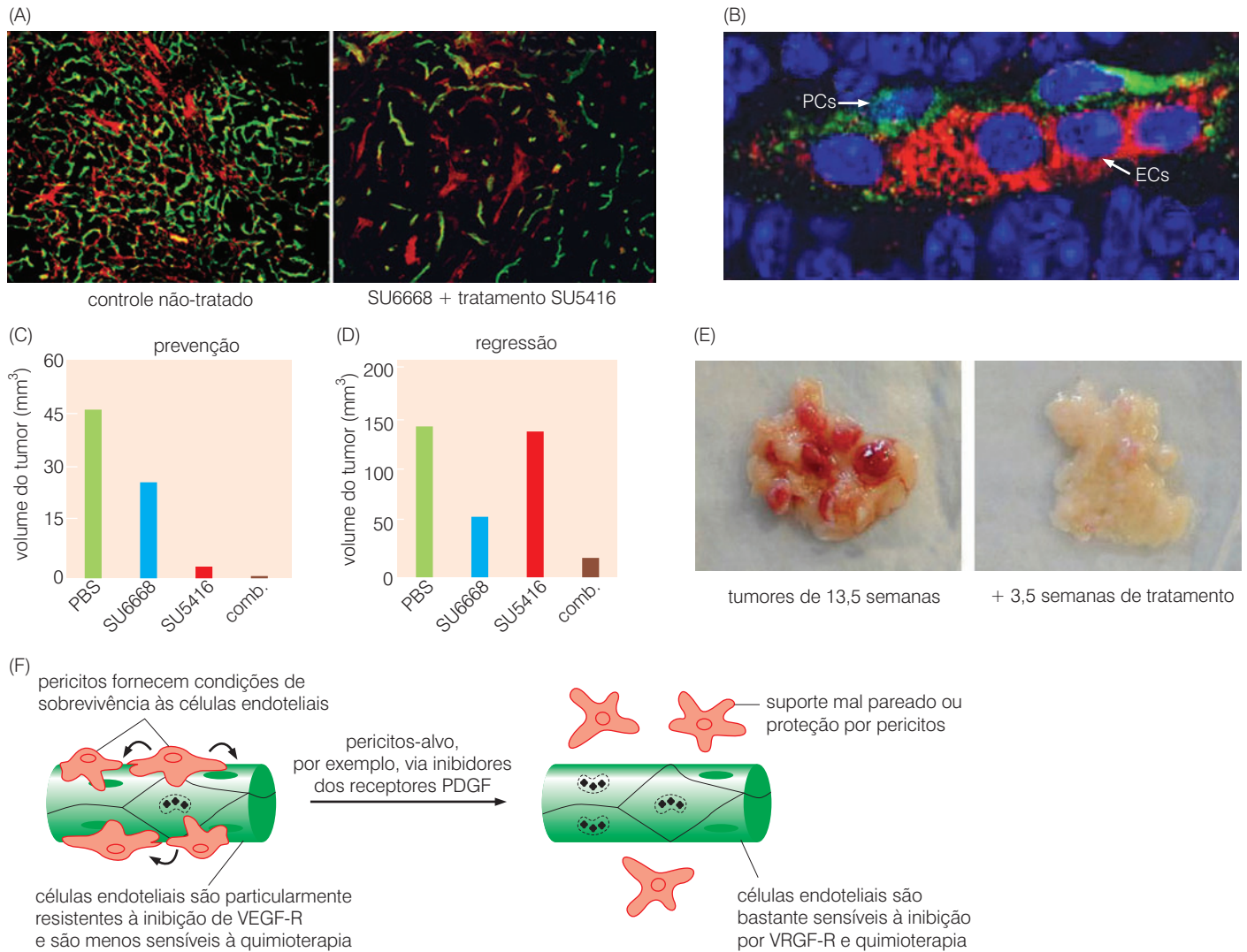


Figura 13.47 Inibidores da angiogênese como tratamento para carcinogênese de células da ilhota O modelo de camundongos transgênicos Rip-Tag de carcinogênese de células da ilhota pancreática torna possível o teste de inibidores farmacológicos antiangiogênicos. (A) O tratamento de camundongos influenciando tumores de ilhota angiogênica estabelecido (esquerda) por quatro semanas, com inibidor do receptor PDGF SU 6668 mais o inibidor de VEGF-R SU5416, resulta na regressão da vascularização (direita). O lúmen dos capilares é marcado por *amarelo*, enquanto os pericitos associados são marcados por *vermelho*. (B) A ação do inibidor de VEGF-R SU6668 pode ser traçada especificamente ao seu efeito nos pericitos que agem como células suporte para células endoteliais. Nesta imagem, um anticorpo reativo com o PDGF-R revela que apenas as células dentro das ilhotas que expressam esses receptores são os pericitos (PCs, *verde*) que são muito associados às células endoteliais (ECs, *vermelho*). O núcleo é marcado por *azul*. (C) Enquanto nem o inibidor de PDGF-R SU6668 (*barra azul*) nem o inibidor do receptor VEGF SU5416 (*barra vermelha*) eram capazes, por si mesmos, de prevenir completamente a formação de tais tumores, os dois aplicados em concerto (combinado, *barra púrpura*) foram bem-sucedidos. PBS, controle salino de fosfato tamponado (*verde*). (D) Em uma tentativa de causar regressão de tumores já formados, SU5416 e SU 6668 foram introduzidos em camundongos Rip-Tag com 12 semanas de vida, sozinhos ou em combinação, e o tamanho dos tumores foi medido

quatro semanas depois. Enquanto o antagonista de VEGF-R SU5416, por si só (*barra vermelha*), apresentou apenas redução mínima do volume do tumor, o antagonista de PDGF-R SU6668 apresentou melhores efeitos (*barra azul*), e os dois juntos (*barra marrom*) trabalharam sinergicamente para reduzir completamente o volume do tumor para cerca de 85%. Isso indica, mais uma vez, que antagonistas de células endoteliais (que dependem de VEGF-R), junto com antagonistas de pericitos suportes (que dependem de PDGF-R), podem agir sinergicamente em terapia antiangiogênica. (E) Os efeitos combinados dessas duas drogas podem ser vistos quando camundongos com 13,5 semanas de vida que desenvolveram tumor substancial das ilhotas pancreáticas (*crescimentos em vermelho, esquerda*) são tratados por 3,5 semanas; com essa terapia combinada seus tumores regredem muito (*direita*). (F) Resumo esquemático dessas e de outras observações indicam que células endoteliais dependem dos pericitos adjuntos muito próximos por vários tipos de suporte biológico. A inibição da sinalização de PDGF, alcançada por certos inibidores, gera a dissociação de pericitos de células endoteliais e passa de sensível para vários tipos de terapias subsequentes, incluindo inibição da função VEGF-R. Isso enfatiza o fato de a terapia antiangiogênese ser mais efetiva quando dois tratamentos atuantes sinergicamente são aplicados. (A, B, e E, de G. Bergers, S. Song, N. Meyer-Morse et al., *J. Clin. Invest.* 111:1287-1295, 2003; C e D, cortesia de D. Hanahan; F, de Pietras e D. Hanahan, *J. Clin. Oncol.* 23:939-952, 2002.)

Terapia combinada usando dois agentes provou ser uma maneira muito potente de intervir em vários estágios da formação do tumor (veja a Figura 13.47C e D). Além disso, a inibição simultânea de ambos os receptores, de VEGF e de PDGF, impediram a troca angiogênica, mantendo virtualmente todas as ilhotas em um estágio pré-angiogênico (> 98%). Essa combinação de drogas bloqueia a expansão posterior de pequenos tumores angiogênicos já estabelecidos em 90% e gera uma regressão de aproximadamente 80% do tamanho do tumor, como feito por outro inibidor PDGF-R, a droga Gleevec, que iremos ler a respeito em maiores detalhes no Capítulo 16. Em alguns camundongos, essa terapia de combinação de drogas manteve tumores já formados em um tamanho pequeno por dois meses.

Significativamente, essas combinações de drogas virtualmente não possuem efeitos tóxicos em tecidos pancreáticos adjacentes a ilhotas neoplásicas, confirmando que capilares recentemente formados dentro de um tumor são muito mais vulneráveis a disrupção do que vasos bem-estabelecidos dentro de tecidos normais. Além disso, pareceu que PDGF desenvolveu função majoritária na iniciação da atração de pericitos aos tubos dos capilares formados por células endoteliais, mas não em tecidos normais, a sinalização contínua de PDGF não foi requerida para manter esta associação. Essas observações indicam que as maneiras mais efetivas de inibição da angiogênese e, além disso, o bloqueio da progressão do tumor, são especialmente dependentes de inúmeros alvos dos tipos celulares que constroem vascularização associada ao tumor.

Os resultados desse tratamento antiangiogênico alvo ilustra a natureza altamente promissora dessa estratégia terapêutica geral. De fato, esse tipo de terapia pode ter sido utilizado por muitos anos: sem conhecimento para a comunidade de oncologistas clínicos, a eficácia de muitas terapias tradicionais antitumorais utilizadas pode também derivar dos seus efeitos em microvascularização associada ao tumor. Um exemplo impressionante disso, que deixa claro como a terapia de radiação sucede na destruição de certos tumores, veio de estudos de camundongos alterados geneticamente nos quais faltam genes que codificam a proteína Bax ou a enzima esfingomielinase ácida (asmase). Ambas as proteínas são importantes reguladores pró-apoptóticas em uma variedade de tipos celulares, incluindo, de forma importante, células endoteliais. Como consequência, as células endoteliais desses camundongos alterados geneticamente são muito mais resistentes a agentes tóxicos, incluindo raios X, do que suas contrapartes tipo selvagem.

Nos experimentos apresentados aqui, células tumorais de camundongo – ou uma linhagem celular de fibrossarcoma ou de melanoma – foram introduzidas dentro de camundongos tipo selvagem e camundongos *asmase*^{-/-}. Após o crescimento de tumores até tamanhos substanciais, esses animais foram expostos a uma dose de 15 *grays* (Gy) de raios X (Figura 13.48A e B). Essa dose de radiação geralmente causa uma redução significativa em um tumor surgido, e de fato isso procede em camundongos tipo selvagem. Entretanto, os tamanhos idênticos dos tumores crescidos em camundongos hospedeiros *asmase*^{-/-} responderam muito diferentemente; a medula óssea de camundongos *asmase*^{-/-} foi substituída com células da medula óssea mutante por transplante, os tumores se tornaram altamente resistentes à morte induzida por raios X (Figura 13.48C).

Esses experimentos demonstraram que a radiosensibilidade de tais tumores não é intrínseca às células tumorais deles próprios. Ao contrário, é dirigida por células hospedeiras, especificamente por células recrutadas dentro de tumores enxertados a partir de medula óssea do hospedeiro. Essas células hospedeiras recrutadas eram de fato células endoteliais, conforme evidenciado pelo fato de que (1) a apoptose de células endoteliais em fragmentos de tumor irradiados *in vitro* conduziram a comparação e previsão do comportamento *in vivo* dos tumores e (2) as únicas células que mostraram apoptose significativa em tumores imediatamente após a irradiação foram associadas a capilares (Figura 13.48B).

Observações como essas indicam que a terapia antiangiogênica desenvolveu um papel ainda maior na **radioterapia** antitumoral convencional; de forma similar, respostas clínicas para certos tipos de quimioterapia convencional podem também ser fortemente influenciadas pela sensibilidade da microvascularização associada ao tumor a estes agentes. Isso sugere que, no futuro, tratamentos com muitas quimioterapias anticâncer poderão ser otimizados medindo seus efeitos nos microvasos associados ao tumor especialmente em células tumorais delas próprias.

13.11 Sinopse e perspectivas

Tecidos de metazoários estão organizados em compartimentos de diferentes tipos celulares que estão continuamente se comunicando entre si. Para o biólogo de desenvolvimento, a necessidade para esse plano organizacional é auto-evidente: somente por meio de tais interações os números apropriados e localizações de cada um desses tipos celulares podem ser confirmados. Essas interações heterotípicas continuam a operar depois que a embriogênese está completa, com o intuito de apoiar a manutenção e o reparo dos tecidos já formados.

Como aprendemos neste capítulo, esse plano organizacional concede outro, de benefício bastante distinto no organismo. Por tornar suas células tão independentes, nenhuma é facilmente capaz de se desprender de sua complexa rede de interações e continuar sozinha. Interdependência impõe o controle que protege o caos da neoplasia.

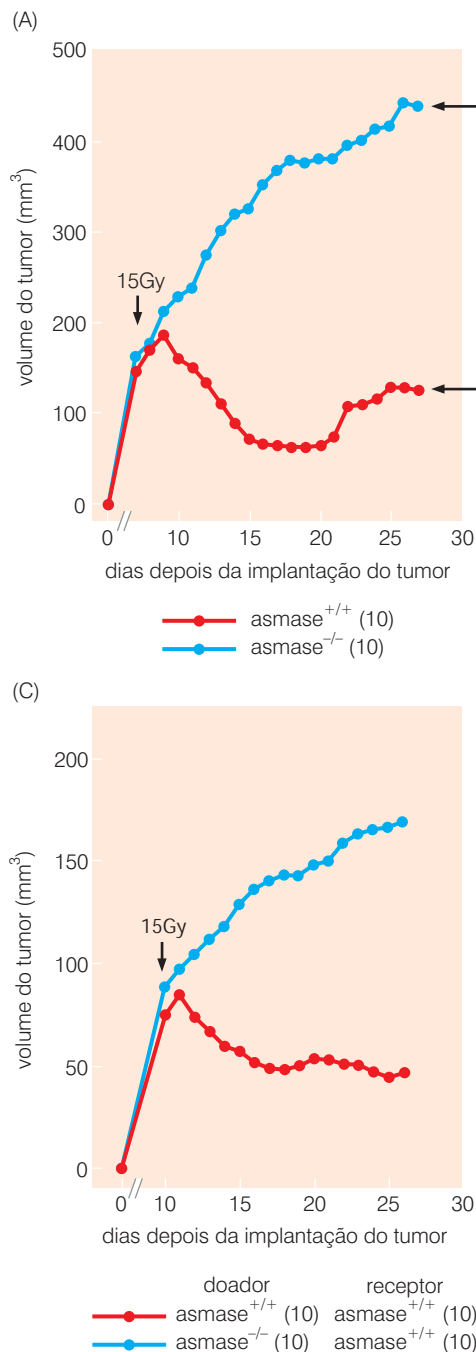


Figura 13.48 Sobrevivência de camundongos tipo selvagem *asfase*^{-/-} possuidores de tumores. As respostas de tumores à radioterapia podem frequentemente ser determinadas por radiosensibilidade de células endoteliais que formam sua vascularização. Camundongos são gerados para serem tanto tipo selvagem como homozigotos nulos para o gene que codifica a enzima pró-apoptótica ácida esfingomielinase (*asfase*). Quando células de fibrossarcoma de camundongo foram implantadas nos tipos selvagem e nos hospedeiros *asfase*^{-/-}, os tumores cresceram duas vezes mais rápido nos camundongos mutantes do que nos camundongos tipo selvagem, sugerindo que um fator hospedeiro, assim como o recrutamento de células endoteliais, estava governando a taxa do crescimento tumoral. (A) Quando esses tumores receberam uma dose terapêutica (15Gy) de radiação (seta), os tumores em camundongos tipo selvagem regrediram (círculos vermelhos preenchidos) e, após um tempo, começaram a crescer novamente. Ao contrário, os tumores em hospedeiros *asfase*^{-/-} continuaram a crescer sem pausa. (B) Quando esses tumores foram examinados microscopicamente após irradiação, as células endoteliais nos tumores carregados por camundongos tipo selvagem (abaixo), identificados por uma célula endotelial específica imunomarcada, eram apoptóticas, como indicado pelo marcador de TUNEL (pontos marrom), enquanto as células endoteliais em tumores originados pelos hospedeiros de *asfase*^{-/-} não apresentaram sinal de apoptose (acima). (C) Quando a medula óssea de hospedeiros tipo selvagem foi substituída por meio do transplante de células da medula tanto de doadores de tipo selvagem como de doadores *asfase*^{-/-}, os tumores implantados em camundongos hospedeiros com enxerto de medula de mutante (curva azul) continuaram a crescer após 15 dias de radiação (seta), enquanto tumores implantados em camundongos hospedeiros enxertados com medula de tipo selvagem foram parados com a radiação (curva vermelha). Isso demonstra que a radiosensibilidade do tumor era determinada pelas células de origem da medula óssea dos hospedeiros, e não pelas células tumorais por elas mesmas. (De M. Garcia-Barros, F. Paris, C. Cordon-Cardo et al., *Science* 300:1155-1159, 2003.)

Barra lateral 13.10 Células de sarcoma de kaposi mantêm o recorde para o número de sinais heterotípicos documentados que elas recebem Sarcomas de Kaposi (KS) parecem derivar de células relacionadas àquelas que geram as endoteliais de revestimento interno de vasos linfáticos. O agente causador de KS – herpesvírus-8 humano (HHV-8) – floresce quando a defesa imune foi comprometida, explicando a alta frequência desses tumores em pacientes com AIDS (veja a Barra lateral 3.10). Análise da expressão de genes de vários laboratórios tem documentado o aumento da expressão de RNAm que codificam 15 receptores distintos em células de KS; os respectivos ligantes para esses receptores parecem não ser produzidos pelas células de KS. Isso sugere que a elevada expressão desses receptores permite a células de KS terem vantagem de ligantes que são supridos, via sinalização *parácrina*, por outros tipos celulares vizinhos. A lista de receptores inclui aqueles ligando os seguintes ligantes: TNF- α , INF-7, oncostatina M, bFGF, VEGF-C e D, insulina, tromboxane A2, IL-2, IL-6, IL-10, IL-13, trombospondina, VEGF 165, CXCL12 e CSF-1. (A dependência de células de KS em todos esses sinais ainda não foi demonstrada experimentalmente.) Essa complexidade aconselha que outros tumores complexos histologicamente, como KS, podem contar com múltiplos sinais heterotípicos para manter sua proliferação e sobrevivência.

Anteriormente vimos a progressão em múltiplas etapas do câncer como sucessivas barreiras fechadas localizadas em trajetos do desenvolvimento de células cancerosas (Capítulo 11). Cada etapa completada com sucesso, se alcançado por trocas genéticas ou epigenéticas, remove um dos obstáculos e coloca a célula cancerosa muito próximo de uma malignidade madura. Agora podemos conceitualizar progressão tumoral de múltiplas etapas de uma maneira diferente: como pré-malignas se desenvolvem em direção à malignidade, elas progressivamente separam seus laços com seus vizinhos e sua dependência no suporte da vizinhança.

Talvez a maior surpresa seja o quão dependente do suporte do estroma a maioria das células cancerosas permanece, em vez de terem completado múltiplas etapas da progressão tumoral. As células epiteliais que residem em muitos carcinomas continuam a se basear em muitas das sinalizações fisiológicas que sustentam seus precursores em tecidos normais (veja, por exemplo, a Barra lateral 13.10). Esse conservadorismo é evidente sob o microscópio. No entanto, um patologista bem-treinado pode reconhecer a origem de cerca de 95% das amostras de tumor vistas ao microscópio, porque a maioria das interações heterotípicas que governam a morfologia normal ainda são importantes na maioria dos cânceres.

Os aproximadamente 5% dos tumores remanescentes representam um desafio, em função de que são anaplásicos e, no entanto, perderam a maioria de suas características histológicas, tornando possível identificar seu tecido de origem. As células desses tumores anaplásicos deixam a maioria das formas de dependência que enlaça seus precursores para células vizinhas normais. De qualquer maneira, a maioria das células tumorais anaplásicas não progrediram totalmente à completa independência, porque elas continuam se organizando para formar tumores sólidos. A última independência é atingida somente por células dos cânceres que tenham avançado tão longe que podem crescer como efusões pleurais ou ascites e, no entanto não possuem nenhum contato direto com células de suporte e, aparentemente, com a matriz extracelular (ECM).

Mesmo sem conhecimento detalhado de interações heterotípicas, a dependência da maioria das células de carcinoma de pelo menos uma forma de suporte estromal pode ter sido predita a partir da conhecida fisiologia de tecidos de mamíferos: virtualmente todos estes dependem de um suprimento sanguíneo funcional. Menos premeditados foram os mecanismos pelos quais tumores adquirem sua vascularização. Ao contrário de invadirem tecidos normais expropriando leitos de capilares existentes, os tumores recrutam ativamente células endoteliais que procedem para construir capilares e grandes vasos de uma massa tumoral.

A fonte dessas células tumorais não pode ser deduzida de um primeiro princípio. A proliferação de células endoteliais na vizinhança de tecidos parece ser o principal mecanismo para a aquisição de nova vascularização logo após pular a troca angiogênica. De qualquer maneira, em muitos tumores, o aglomerado de vasos criados logo após parece ser construído por células que se originam na medula óssea e então se diferenciam no tumor do estroma em células endoteliais funcionais. A contribuição dessas células precursoras endoteliais circulantes (EPCs) à vascularização associada ao tumor parece variar de um tumor para outro, mas claramente representa uma fonte significativa em muitas neoplasias.

Maiores aspectos de angiogênese parecem pouco entendidos, até mesmo paradoxais. Por exemplo, parece óbvio que uma vez que os tumores se tornam angiogênicos, eles podem permanecer em fases prolongadas de crescimento e expansão, e esses tumores que são mais angiogênicos podem crescer mais rapidamente do que aqueles que são menos capazes de atrair nova vascularização. De fato, como lemos, medidas de densidade microvascular – número de capilares por campo de microscópio – correlacionam-se bem com a probabilidade de que um tumor primário, como câncer de mama, irá progredir para um ponto final de alta malignidade.

O paradoxo surge de freqüentes observações de que pacientes possuindo tumores altamente hipóxicos também confrontam baixo prognóstico. Isso não faz sentido, levando em consideração que hipoxia não supre células tumorais e freqüentemente leva à morte por apoptose e, em uma escala maior, extensas regiões necróticas em um tumor. O paradoxo pode ser um

dia resolvido por provocar a ação de fatores de transcrição HIF-1, que se tornam ativados em células hipóxicas (Seção 7.12) e induzem a produção de grande número de outras proteínas, mas não de VEGF. De fato, os altos níveis na expressão de HIF-1 podem também ser um fraco indicador de prognóstico clínico; incluído dentre esses genes ativados por HIF-1, estão aqueles que especificam PDGF, TGF- α , TGF- β e diversas metaloproteinases da matriz (MMPs) que são responsáveis por remodelar a matriz extracelular (ECM). Como aprendemos, muitas dessas proteínas secretadas atuam como potentes mitógenos que direcionam a proliferação de ambas as células epiteliais e seus vizinhos do estroma.

Um gene indutor adicional HIF-1 codifica a proteína Met, cujas funções como receptores para fatores de crescimento de hepatócitos (HGF), também conhecido por fator de dispersão (SF). Uma vez que o receptor Met é ativado por se ligar ao seu ligante HGF, ele ativa um amplo conjunto de respostas em células epiteliais, incluindo transição epitelial mesenquimal (EMT), motilidade aumentada, invasividade e proliferação. HGF parece ser altamente disponível em tumores humanos de ambas as origens, mesenquimal e epitelial. Conseqüentemente, HIF-1 faz a mediação do aumento da expressão de Met e pode sensibilizar células tumorais a moléculas HGF que estão presentes ao seu redor, assim como as HGF que têm sido liberadas pelas células estromais. Esses produtos diversos da ação de HIF-1 podem, portanto, ajudar a explicar o prognóstico pobre ligado a tumores hipóxicos, os quais obtêm sucesso, em vez de grande adversidade, e realmente se tornam mais agressivos do que suas contrapartes bem-oxigenadas.

A descoberta recente de interações dinâmicas entre tumores e a medula óssea foi uma surpresa para a maioria dos pesquisadores do câncer. Na ausência de metástase, a maioria dos tumores têm sido tradicionalmente considerados como sendo doenças localizadas confinadas a uma ou outra parte do corpo. Mas, como aprendemos mais sobre as células do compartimento estromal, percebemos que mesmo tumores localizados estendem seu alcance distante e amplamente através do corpo com o intuito de recrutar células que são necessárias para suportar sua própria sobrevivência e programas de proliferação. Além disso, precursores de células endoteliais (EPCs), citados anteriormente, carcinomas recrutam mastócitos e monócitos a partir da medula óssea, para posterior diferenciação em macrófagos. Até mesmo alguns fibroblastos e miofibroblastos estromais podem possuir origens na medula óssea, já que eles podem freqüentemente se desenvolver a partir de células precursoras circulantes chamadas fibrócitos.

A fisiologia dos carcinomas, a qual enfocamos neste capítulo, é muito mais complexa do que trocas bidirecionais de sinalização entre epitélio e estroma. O estroma é composto por mais de seis tipos celulares distintos (fibroblastos, miofibroblastos, células endoteliais, pericitos, células da musculatura lisa, mastócitos, macrófagos, linfócitos e, em alguns tecidos, adipócitos), cada um dos quais sinaliza células epiteliais neoplásicas, assim como outros componentes do compartimento estromal. Cientistas têm se esforçado, sem sucesso, para solucionar os três problemas do corpo. Neste capítulo, confrontamos um mundo de oito ou mais tipos celulares distintos de tipos celulares, cada um dos quais está mandando uma mistura de sinais complexos para outros tipos de células entre tumores. Apenas começamos a esboçar a superfície de um complexo de interações epitelial-estromal operando em tecidos neoplásicos e em suas contrapartes normais.

Por mais de meio século, grupos de oncologistas se focaram em erradicar o conjunto de células cancerosas de um tumor sólido, com a esperança de atingir o impossível – tratamento de carcinomas comuns que foram tradicionalmente incuráveis. Como aprendemos primeiro no Capítulo 11 e agora neste, esse foco necessita ser radicalmente redirecionado. Primeiro, os verdadeiros alvos de terapias anticâncer não podem mais ser o conjunto de células neoplásicas em um tumor, porque elas possuem capacidade limitada de auto-renovação; ao contrário, é provável que descubramos que curas verdadeiramente duráveis podem ser apenas de células-tronco tumorais erradicadas que permaneceram elusivas e se esconderam, em alguns locais, por meio de massa tumoral e que elas representam seus sistemas de auto-renovação. Segundo, muitas das terapias anticâncer são úteis para serem desenvolvidas no futuro e não se tornarem alvos a partir das células cancerosas por elas próprias. Em vez disso, elas podem freqüentemente ser muito mais adeptas

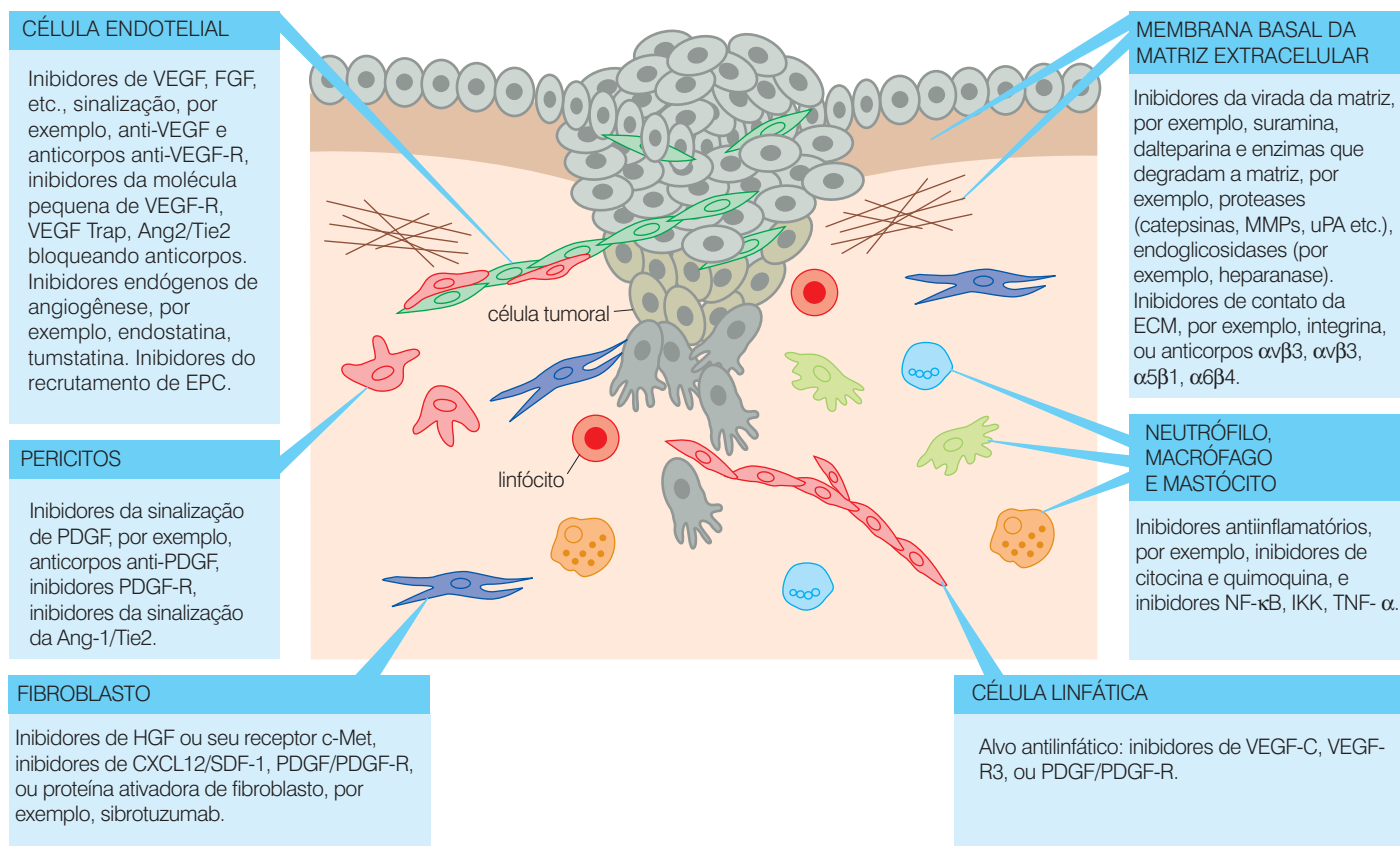


Figura 13.49 Interações heterotípicas como alvos para intervenção terapêutica. Como descrito neste capítulo, células cancerosas são dependentes do microambiente ao redor do estroma para uma variedade de suportes fisiológicos das células. Esta dependência nas interações heterotípicas inspirou um novo tipo de terapia do câncer, algumas das quais foram caracterizadas neste capítulo. Ao invés de se focarem nos defeitos intracelulares de sinalização dentro das células, este novo tipo de terapia é diretamente direcionado a sinalização heterotípica de interrupção, portanto privando células cancerosas do suporte essencial do estroma. Este esquema indica algumas das terapias anti-tumor que estão sendo desenvolvidas ou sob consideração. (De J.A. Joyce, *Cancer Cell* 7:513-520, 2005.)

a atacar as células que lhes fornecem um suporte fisiológico vital; por questionar a rede elaborada de suporte estromal da qual a maioria das células cancerosas depende, a verdadeira regressão dramática de tumores sólidos poderá um dia ser atingido (Figura 13.49).

O fato de tumores serem “lesões que não curam” se estendeu e ecoou em nossas discussões anteriores (Seção 11.15), em que a função crítica de inflamação crônica em promover formação de tumor foi discutida com grande profundidade. Inflamação e cicatrização da lesão são processos interligados, e os mecanismos de inflamação guiados por promoção tumoral, que levam à formação de câncer, são estendidos e elaborados pela cicatrização da lesão crônica que parece caracterizar melhor a biologia do estroma de tumores bem-estabelecidos.

Nesse ponto, também há uma nova surpresa. Células inflamatórias, especialmente macrófagos, têm sido tradicionalmente descritas como soldados de linha de frente da resposta imune que lidam com agentes infecciosos efetivos, como as bactérias, por fagocitá-las e ajudar a guiar a resposta imune por meio de apresentação antigênica, como veremos no Capítulo 15. Agora aprendemos que macrófagos são também agentes críticos em produzirem fatores de crescimento mitogênicos, liberando fatores angiogênicos e regulando a matriz extracelular (ECM); o último processo citado também é crítico para invasão e metástase tumoral (Capítulo 14).

Então, o trabalho tradicional de vários tipos celulares diferenciados está sendo estendido e embaçado. Células do sistema imune, que são determinadas a nos proteger de infecções e de câncer, são frequentemente ativadas por colaboradores em desenvolvimento tumoral. E a deleção de um ou outro tipo celular a partir do sistema imune, alcançada em camundongos por meio da linhagem germinativa por engenharia, com frequência cria um organismo hospedeiro que é, paradoxalmente, menos capaz de suportar tumorigênese.

Programas normais e bastante elaborados de morfogenética, assim como cicatrização da lesão e transição mesenquimal-epitelial (EMT), são prováveis de explicar como células do carcino-

ma são espertas o suficiente para obter os fenótipos celulares complexos de que elas necessitam a fim de executar os estágios tardios da progressão maligna. Em retrospecto, essa noção não é tão surpreendente, uma vez que, quanto mais aprendemos sobre as células cancerosas, mais percebemos o quanto elas são oportunistas na cooptação e exploração dos processos biológicos normais a fim de atingir seus próprios objetivos. Isso deixa a última questão deste capítulo: começamos a realmente compreender a complexidade mecanística das interações heterotípicas ou há um universo inteiro de rotas de sinalização e programas comportamentais não-descobertos que se ocultam dentro dos tumores, esperando, como a matéria negra intergaláctica, para nos surpreender?

Conceitos-chave

- Os tumores são tecidos complexos que dependem da intercomunicação entre vários tipos celulares. Na verdade, a maioria dos tumores é tão histologicamente complexa quanto os tecidos normais dos quais se originam.
- Nos carcinomas, esses tipos celulares podem ser separados em células neoplásicas epiteliais e células recrutadas do estroma, as quais incluem fibroblastos, miofibroblastos e macrófagos, bem como os vários tipos celulares que participam da construção da vascularização associada a tumores, especificamente células endoteliais, pericitos e células musculares lisas.
- A maioria dos carcinomas depende totalmente de células recrutadas do estroma para vários tipos de suporte fisiológico. Essa dependência se perde apenas no pequeno subconjunto de tumores que progridem a um estado extremamente maligno, em especial as células tumorais que crescem em ascitos e no fluido pleural.
- Em nível bioquímico, esta interdependência se manifesta pela troca de vários tipos de fatores mitogênicos e tróficos. Por exemplo, as células de carcinoma podem liberar PDGF para recrutar e ativar células do estroma, enquanto as últimas respondem pela liberação de IGFs que sustentam as células de carcinoma.
- A formação da vascularização associada a tumores, formada pelo processo de neoangiogênese, é um determinante crítico e limitado do crescimento de todos os tumores maiores do que aproximadamente 0,2 mm.
- No caso dos carcinomas, a aquisição do estroma associado a tumores se assemelha ao processo de cura em tecidos epiteliais lesionados. A gênese do estroma depende, portanto, dos mesmos programas de expressão gênica que são ativados durante a cura de lesões.
- À medida que procede a progressão do tumor, o estroma rico em fibroblastos é crescentemente substituído por miofibroblastos, os quais eventualmente geram o estroma rico em colágeno e desmoplásico.
- O recrutamento das células que participam diretamente da construção da neovascularização de tumores envolve a liberação de fatores, tais como VEGF, tanto pelas células tumorais como pelas células inflamatórias, em especial macrófagos.
- A neoangiogênese representa um alvo atraente para o desenvolvimento de novos agentes anticâncer, em que as células-alvo são os vários tipos celulares normais do estroma que participam da angiogênese, em vez das células cancerosas em constante mudança.

Questões elaboradas

1. Que diferentes linhas de evidência provam diretamente que a maioria das células de carcinoma depende dos tipos celulares estromais para vários tipos de suporte fisiológico?
2. Como as terapias antiangiogênese podem melhorar (em alguns casos) ou neutralizar (em outros casos) a eficácia de agentes quimioterápicos convencionais?
3. Como os macrófagos podem facilitar ou antagonizar a tumorigênese?
4. Quais linhas de evidência convencem que a geração do estroma associado a tumores depende dos mesmos programas biológicos que são ativados durante a cura de lesões?
5. Quais forças biológicas fazem com que a vascularização associada a tumores seja deficiente em tantos aspectos?
6. Que tipos de agentes terapêuticos anticâncer você desenvolveria a fim de efetuar o colapso de um tumor estabelecido?

7. Que estratégias bioquímicas as células tumorais podem usar para diminuir sua dependência do suporte estromal?
8. Você pode citar exemplos de como as oncoproteínas perturbam as interações entre as células de carcinoma e o estroma associado a tumor próximo?
9. Como você poderia determinar qual a proporção de células endoteliais na vascularização de um tumor que deriva da expansão da vascularização adjacente e qual a proporção dessas células que se origina das células precursoras endoteliais circulantes?

Leitura adicional

- Balkwill F & Mantovani A (2001) Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* 357, 539–545.
- Bergers G & Benjamin LE (2003) Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat. Rev. Cancer* 3, 401–410.
- Bhowmick NA, Neilson EG & Moses HL (2004) Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature* 432, 332–337.
- Bingle L, Brown NJ & Lewis CE (2002) The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. *J. Pathol.* 196, 254–265.
- Bissell MJ & Radisky D (2001) Putting tumours in context. *Nat. Rev. Cancer* 1, 46–54.
- Bouck N, Stellmach V & Hsu SC (1996) How tumors become angiogenic. *Adv. Cancer Res.* 69, 135–174.
- Carmeliet P (2000) Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat. Med.* 6, 389–395.
- Conway EM & Carmeliet P (2003) Cardiovascular biology: signalling silenced. *Nature* 425, 139–141.
- Coussens LM & Werb Z (2002) Inflammation and cancer. *Nature* 420, 860–867.
- Doljanski F (2004) The sculpturing role of fibroblast-like cells in morphogenesis. *Perspect. Biol. Med.* 47, 339–356.
- Dvorak HF (1986) Tumors: wounds that do not heal. *N. Engl. J. Med.* 315, 1650–1689.
- Dvorak HF (2002) Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. *J. Clin. Oncol.* 20, 4368–4380.
- Dvorak HF (2003) How tumors make bad blood vessels and stroma. *Am. J. Pathol.* 162, 1747–1757.
- Elenbaas B & Weinberg RA (2001) Heterotypic signaling between epithelial tumor cells and fibroblasts in carcinoma formation. *Exp. Cell Res.* 264, 169–184.
- Ferrara N (2002) VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. *Nat. Rev. Cancer* 2, 795–803.
- Ferrara N, Gerber HP & LeCouter J (2003) The biology of VEGF and its receptors. *Nat. Med.* 9, 669–676.
- Folkman J & Kalluri R (2003) Tumor angiogenesis. In *Cancer Medicine*, 6th ed (DW Kufe, RE Pollock, RR Weichselbaum et al. eds), pp. 161–194. Hamilton, Ontario: BC Decker.
- Gold LI (1999) The role for transforming growth factor-beta (TGF-beta) in human cancer. *Crit. Rev. Oncol.* 10, 303–360.
- Hanahan D & Folkman J (1996) Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 86, 353–364.
- Harris AL (2002) Hypoxia—a key regulatory factor in tumour growth. *Nat. Rev. Cancer* 2, 38–47.
- Jain RK (1994) Barriers to drug delivery in solid tumors. *Sci. Am.* 271(1), 58–65.
- Jain RK (2003) Molecular regulation of vessel maturation. *Nat. Med.* 9, 685–693.
- Jain RK (2005) Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science* 307, 58–62.
- Jain RK & Booth MF (2003) What brings pericytes to tumor vessels? *J. Clin. Invest.* 112, 1134–1136.
- Kalluri R (2003) Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nat. Rev. Cancer* 3, 422–433.
- Kalluri R & Neilson EG (2003) Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J. Clin. Invest.* 112, 1776–1784.
- Kerbel RS (2000) Tumor angiogenesis: past, present and the near future. *Carcinogenesis* 21, 505–515.
- Kerbel R & Folkman J (2002) Clinical translation of angiogenesis inhibitors. *Nat. Rev. Cancer* 2, 727–739.
- Leek RD & Harris AL (2002) Tumor-associated macrophages in breast cancer. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 7, 177–189.
- Littlepage LE, Egeblad M and Werb Z (2005) Evolution of cancer and stromal cellular responses. *Cancer Cell* 7, 499–500.
- McCawley LJ and Matrisian LM (2001) Matrix metalloproteinases: they're not just for the matrix anymore! *Curr. Opin. Cell Biol.* 13, 534–540.
- McDonald DM & Baluk P (2002) Significance of blood vessel leakiness in cancer. *Cancer Res.* 62, 5381–5385.
- McDonald DM & Foss AJ (2001) Endothelial cells of tumor vessels: abnormal but not absent. *Cancer Metastasis Rev.* 19, 109–120.
- Mueller MM & Fusenig N (2004) Friends or foes—bipolar effects of the tumour stroma in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 4, 839–849.
- Nyberg P, Xie L & Kalluri R (2005) Endogenous inhibitors of angiogenesis. *Cancer Res.* 65, 3967–3979.
- Pepper MS (2001) Lymphangiogenesis and tumor metastasis: myth or reality? *Clin. Cancer Res.* 7, 462–468.
- Rabbani SY, Heissig B, Hattori K & Rafii S (2003) Molecular pathways regulating mobilization of marrow-derived stem cells for tissue revascularization. *Trends Mol. Med.* 9, 109–117.
- Radisky D, Hagios C & Bissell MJ (2001) Tumors are unique organs defined by abnormal signaling and context. *Semin. Cancer Biol.* 11, 87–95.
- Rafii S, Lyden D, Benezra R et al. (2002) Vascular and hematopoietic stem cells: novel targets for anti-angiogenesis therapy? *Nat. Rev. Cancer* 2, 826–835.
- Savagner P (2001) Leaving the neighborhood: molecular mechanisms involved during epithelial-mesenchymal transition. *BioEssays* 23, 912–923.
- Serini G & Gabbiani G (1999) Mechanisms of myofibroblast activity and phenotypic modulation. *Exp. Cell Res.* 250, 273–283.
- Sleeman JP (2000) The lymph node as a bridgehead in the metastatic dissemination of tumors. *Recent Results Cancer Res.* 157, 55–81.
- Thiery JP (2003) Epithelial-mesenchymal transitions in development and pathologies. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15, 740–746.
- Tlsty T (2001) Stromal cells can contribute oncogenic signals. *Semin. Cancer Biol.* 11, 97–104.
- Walker RA (2001) The complexities of breast cancer desmoplasia. *Breast Cancer Res.* 3, 143–145.
- Wiseman BS & Werb Z (2002) Stromal effects on mammary gland development and breast cancer. *Science* 296, 1046–1049.



CAPÍTULO 14

Expandindo-se: Invasão e Metástase

“O fato de células idênticas àsquelas do câncer serem encontradas no sangue poderia levar a alguma luz sobre a origem da existência de tumores múltiplos em uma mesma pessoa.”

T.R. Ashworth, médico, 1869

“Não é o nascimento, casamento ou morte, mas a gastrulação o momento verdadeiramente mais importante na sua vida.”

Lewis Wolpert, embriologista, 1986

Nas fases iniciais de múltiplas etapas de progressão tumoral, células de câncer se multiplicam no local onde suas células antecessoras perderam o controle da proliferação. O resultado normalmente aparece muitos anos depois, como uma massa **tumoral primária**. Dado o fato de que um centímetro cúbico de tecido pode conter entre 10^9 ou 10^{10} células, pode-se facilmente imaginar que tumores com frequência atingem um tamanho de 10^{10} ou 10^{11} células antes de tornarem-se evidentes para o indivíduo portador ou para o clínico que o examina.

Tumores primários, em alguns órgãos – especificamente aqueles que surgem no espaço peritoneal ou pleural –, podem se expandir sem causar nenhum desconforto para o paciente, simplesmente porque essas cavidades se expandem e seus conteúdos são bastante plásticos; em outros locais, como o cérebro, a presença de um tumor com frequência é aparente quando ele ainda está relativamente pequeno. Mais cedo ou mais tarde, entretanto, em todos os locais do corpo, tumores de tamanhos substanciais comprometem o funcionamento dos órgãos nos quais surgiram e começam a provocar sintomas.

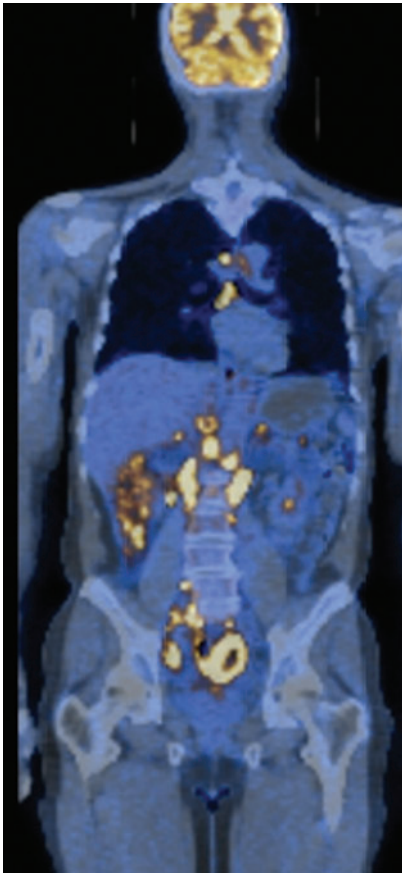


Figura 14.1 Tumores disseminados O diagnóstico de doença metastática frequentemente representa a sentença de morte para pacientes com câncer, já que os mecanismos pelos quais as células de câncer fazem metástase de um tumor primário para locais distantes no corpo permanecem pouco entendidos. Vista aqui, uma varredura de todo o corpo de um paciente com metástase de linfoma não-Hodgking (NHL). Esta é uma imagem de CT (tomografia de raios X computadorizada) dos tecidos do corpo (*cinza, azul*) e PET (tomografia por emissão de pósitrons), na qual a tomada da fluorodesoxiglicose marcada radiativamente (FDG) em vários tecidos (*amarelo*) é detectada. A tomada de FDG indica regiões de alta atividade do metabolismo celular. A atividade associada ao cérebro é normal. Entretanto, a presença de numerosos sinais amarelos na região abdominal indica múltiplas metástases NHL. (Cortesia de S.S. Gambhir.)

Em muitos casos, os efeitos na função do tecido normal vêm da pressão física exercida pela expansão da massa tumoral. Em outros, células da massa tumoral primária invadem o tecido normal adjacente e, assim, começam a comprometer funções vitais. Tumores grandes no cólon podem obstruir a passagem dos produtos da digestão através do lúmen e, em tecidos como o fígado e o pâncreas, células do câncer podem obstruir o fluxo da bile através de ductos críticos. No pulmão, vias aéreas podem ser comprometidas.

Apesar de insidiosos e corrosivos, os tumores primários são responsáveis fundamentalmente por apenas 10% das mortes por câncer. Os 90% restantes de pacientes são atacados por crescimentos cancerosos descobertos em locais distantes no seu corpo onde o tumor primário surgiu (Figura 14.1; veja também a Figura 2.2). Essas **metástases** são formadas por células de câncer que deixaram a massa tumoral primária e viajaram pelas estradas do corpo – sangue e vasos linfáticos – para buscar novos locais, por todas as partes do corpo, onde possam fundar novas colônias (Figura 14.2). Cânceres de mama com frequência procriam colônias metastáticas promiscuamente em muitos tecidos de todo o corpo, incluindo cérebro, fígado, ossos e pulmão. Tumores de próstata são mais frequentemente disseminados para ossos, enquanto carcinomas de cólon preferencialmente formam novas colônias no fígado.

Tais células de câncer (móveis/migratórias) são as manifestações mais perigosas do processo de câncer. Quando têm sucesso em fundar colônias em locais distantes, causam grandes destruições. O corpo feminino pode prescindir de suas glândulas mamárias sem perder funções fisiológicas vitais, e então quase todos os carcinomas de mama primários não comprometem a sobrevivência enquanto estão confinados às mamas. De qualquer modo, colônias metastáticas de câncer de mama em ossos podem causar erosão localizada no tecido ósseo, resultando em dor agonizante e colapso do esqueleto. Metástases do cérebro podem rapidamente comprometer a função do sistema nervoso central, enquanto aqueles de pulmão ou fígado são similarmente ameaçadores para a vida, devido às funções desses órgãos.

Por razões que permanecem obscuras, tumores em certos tipos de tecidos têm uma alta probabilidade de metástase, ao passo que, em outros tecidos, raramente ocorre metástase. Depois que melanomas primários penetram a uma certa distância em direção ao tecido subjacente à pele, a presença de metástase em locais distantes do corpo é quase uma certeza. Ao contrário, carcinomas de células escamosas da pele e astrocitomas – tumores primários de células da glia no cérebro – raramente desenvolvem metástase.

Em uma variedade de tipos de tumores humanos, a disseminação de células de câncer através do corpo ocorre pelo tempo em que o tumor primário é primeiro detectado; no momento do diagnóstico inicial, essas células espalhadas seriam não-aparentes, porque elas apenas formam colônias de tumores pequenas – *micrometástases*. Tais comportamentos provocam uma questão que será confrontada neste capítulo e ainda no Capítulo 16: mesmo após o tumor primário ser retirado cirurgicamente, se as propriedades deste, que

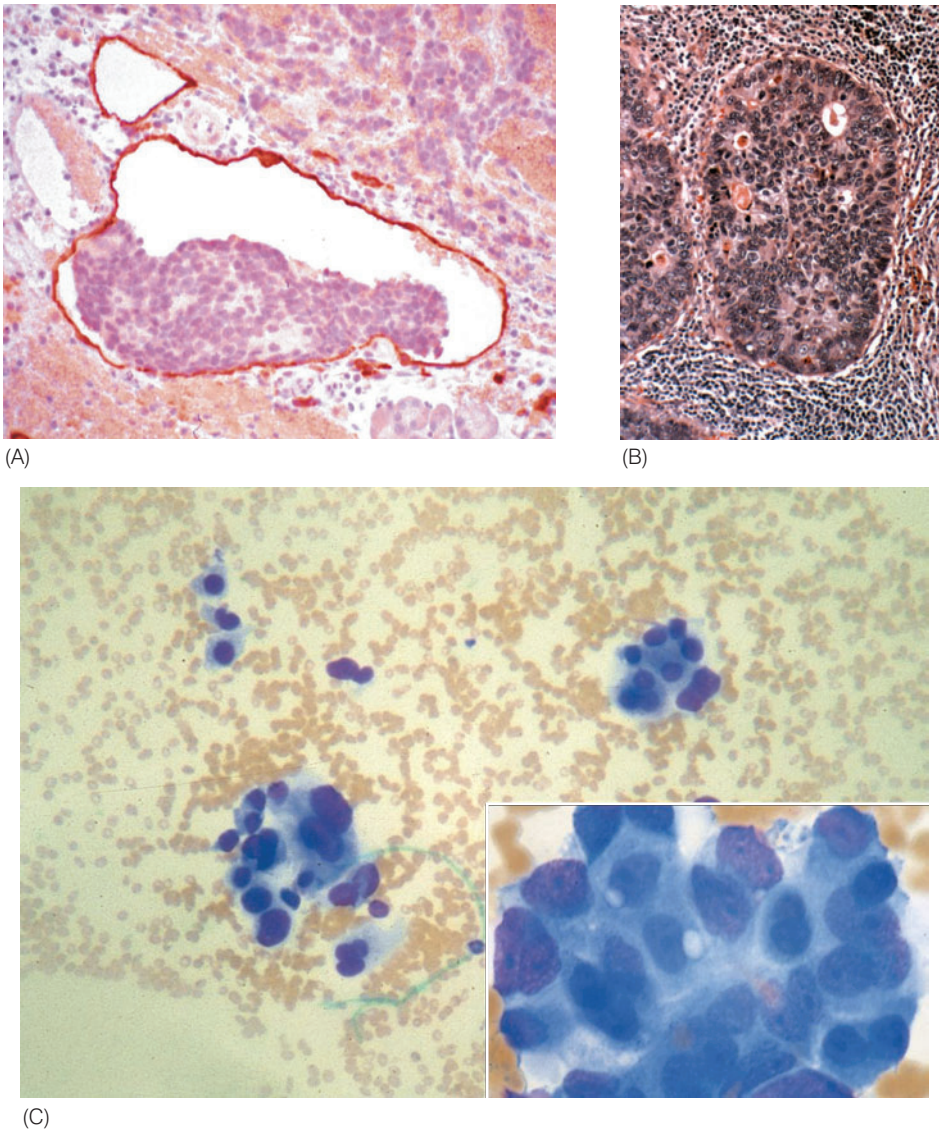


Figura 14.2 Histologia de metástases em vários tecidos do corpo (A) No camundongo transgênico Rip-Tag, modelo de tumorigênese em ilhota pancreática (veja a Figura 13.37), metástase via linfonodos pode ser encorajada pela expressão forçada de VEGF-C, um fator linfangiogênico, nas células de tumor das ilhotas. Uma pequena metástase nas células das ilhotas pode ser vista (rosa-escuro) para um vaso linfático alinhado com células epiteliais (marrom). (B) Uma pequena metástase de câncer de mama humano pode ser vista crescendo dentro de um linfonodo associado a ductos drenantes da mama. Note que essas metástases exibem uma estrutura detalhada, incluindo ductos e estroma, característicos de muitos tumores primários de mama, bem como numerosos linfócitos a ductos de linfa que os envolvem (*núcleos pretos*). (C) A presença de células de carcinoma metastáticas (*azul*) na medula óssea pode ser revelada usando-se imunohistoquímica específica para detectar células apresentando marcadores epiteliais, agrupando-as fora das células mesenquimais, presentes naturalmente na medula; ou, como visto aqui, por meio do corante Wright-Giemsa, que confere a cor azul. (A, S.J. Mandriota, L. Jussila, M. Jeltsch et al., *EMBO J.* 20:672-682, 2001; B, cortesia de T.A. Ince; C, A.T. Skarin, *Atlas of Diagnostic Oncology*, 3rd ed. Philadelphia: Elsevier Science Ltd., 2003.)

determinam se a sua disseminação (doença metastática) através do corpo, poderiam finalmente representar uma ameaça à vida.

Neste capítulo, confrontamos os processos que criam os produtos mais agressivos da progressão tumoral. Esses processos dependem de trocas biológicas e bioquímicas complexas em células de câncer e estroma associado. Muitos dos passos da formação do câncer, como descrito nos capítulos anteriores, são entendidos em detalhes consideráveis. Em contraste, nosso entendimento de invasão e metástase é ainda incompleto, o que explica porque esses passos tardios da progressão tumoral representam o principal problema a ser solucionado na patogênese do câncer.

14.1 Trajeto de células de câncer de um tumor primário para um local de metástase em potencial depende de uma série de passos biológicos complexos

A grande maioria (> 80%) de câncer com risco de morte ocorre em tecidos epiteliais, produzindo carcinomas. Conseqüentemente, muitas das nossas discussões neste capítulo, como a anterior, se referirão a essa classe de tumor, com o entendimento de que o câncer chega em

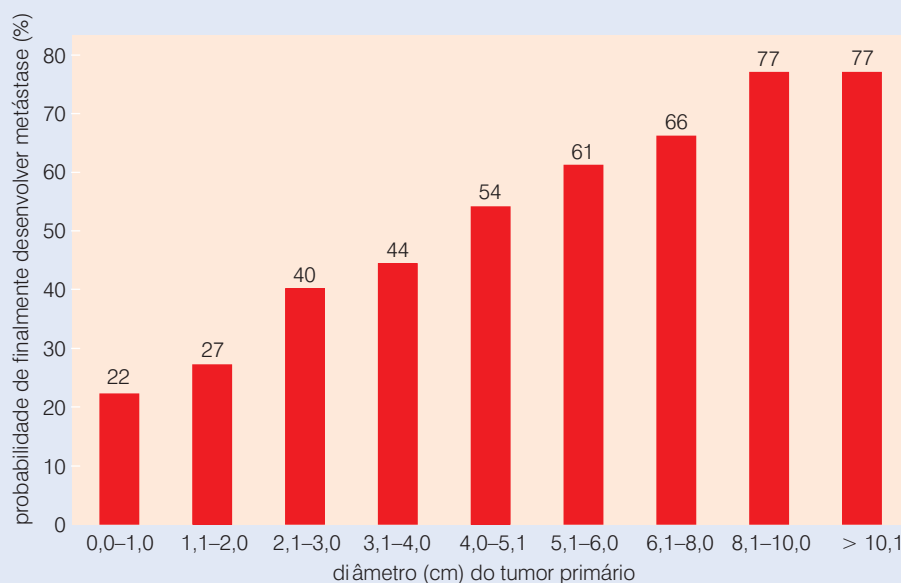
Barra lateral 14.1 A conexão entre tamanho do tumor e prognóstico da doença não é clara A medida do tamanho do tumor primário pode freqüentemente ser correlacionada com a probabilidade do tumor já ter feito metástase em sítios distantes no corpo. Por exemplo, como indicado na Figura 14.3, em um estudo, 22% de mulheres com câncer de mama primário com menos de 1 cm de diâmetro (no diagnóstico inicial) eventualmente desenvolvem doença metastática. Em contraste, 77% daquelas mulheres cujos tumores primários foram maiores de 8 cm em diâmetro progridem para a doença metastática. Independentemente dessas medidas, existem outras indicando que, em geral, grandes tumores passaram por mais passos genéticos (e epigenéticos) da progressão tumoral. Então, 4% dos casos de câncer de mama com menos de 1 cm de diâmetro têm sido encontrados portando alelos *p53* mutantes, enquanto 42% dos tumores maiores de 3 cm carregam essa mutação. Poderia se concluir, dessas observações, que a habilidade em fazer metástase é adquirida pelas células de câncer como um relativo passo tardio na progressão do tumor quando o tumor primário está se expandindo de um tamanho pequeno para um maior. Além disso, a aquisição dessa habilidade poderia ser devida à perda da função de *p53*.

Na verdade, o verdadeiro significado dessas estatísticas é difícil de avaliar e pode ser explicado por vários mecanismos alternativos: (1) o

traço da metástase pode ser adquirido apenas relativamente tarde no crescimento do tumor primário, limitando, portanto, essa habilidade às células presentes em tumores primários maiores. (2) Células de câncer individuais em pequenos e grandes tumores podem ser igualmente capazes de fazer metástase. Entretanto, tumores maiores podem despachar proporcionalmente um grande número de células em metástase (por unidade de tempo) para o resto do corpo simplesmente porque ele contém mais células. (3) Em algum ponto durante os múltiplos passos da progressão tumoral, essas células mostram uma aumentada habilidade em proliferar no tumor primário, também exibindo um traço fortemente associado – a habilidade em fazer metástase. Essas células de câncer geram grandes tumores primários mais rapidamente do que outras células que proliferam lentamente, e essas células se multiplicando rapidamente servem como fonte de grande disseminação de metástase.

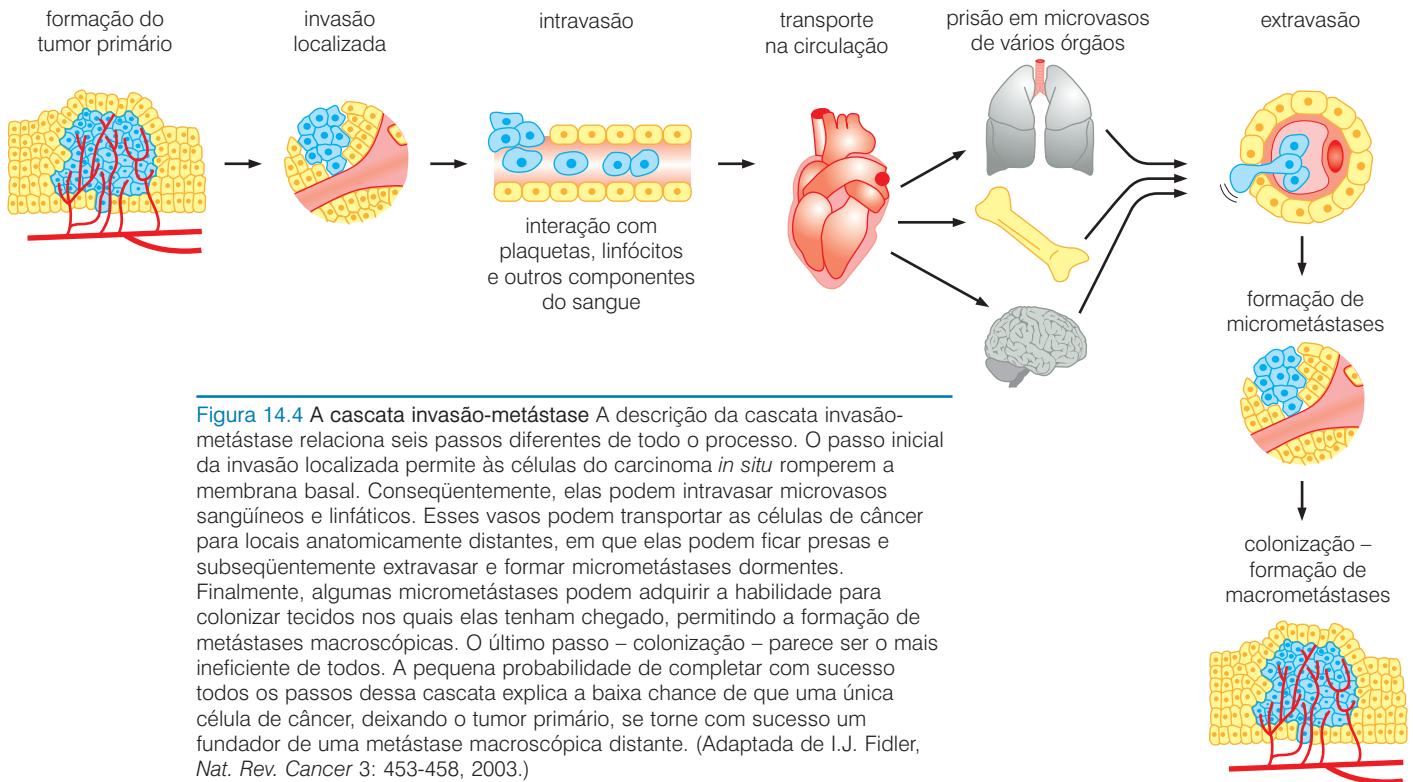
Argumentos similares aplicam-se a genes mutantes presentes em tumores avançados: a grande freqüência de mutação no alelo *p53* em tumores maiores poderia não significar que esse alelo mutante seja adquirido tardiamente na progressão de tumores primários. Em vez disso, populações de células tumorais que adquirem alelos mutantes *p53* relativamente cedo nos múltiplos passos da progressão tumoral, poderiam ser hábeis em crescer rapidamente e gerar tumores de tamanho grande.

Figura 14.3 Tamanho do tumor primário e risco de metástase Este gráfico de barras revela que, conforme aumenta o diâmetro de um câncer de mama primário inicialmente diagnosticado aumenta a probabilidade de metástases distantes em pacientes. Isso é indicado aqui como porcentagem de mulheres portadoras de tumores primários de um dado tamanho que eventualmente desenvolvem metástases macroscópicas distantes. Neste estudo, 1.589 pacientes de câncer de mama foram acompanhadas por períodos de até 46 anos depois do diagnóstico inicial e tratamento. (R. Heimann e S. Hellman, *J. Clin. Oncol.* 16: 2686-2692, 1998.)



outros tipos de tecido, como conectivo e nervoso, freqüentemente seguindo um caminho similar quando se tornam invasivos e metastáticos. Mesmo certos tumores hematopoiéticos, notavelmente linfomas, com freqüência têm uma fase inicial localizada e uma fase tardia, durante a qual eles se tornam disseminados para locais anatomicamente distantes (veja a Figura 14.1). Essa seqüência complexa de passos, algumas vezes chamada *cascata invasão-metástase* está ilustrada na Figura 14.4.

Nosso foco em carcinomas requer que façamos discussões iniciais sobre esses tumores e tecidos epiteliais em que eles surgem (veja, por exemplo, as Seções 2.2 e 13.1). Recapitulando brevemente, a grande maioria de tecidos epiteliais é construída de acordo com um conjunto comum de princípios arquitetonômicos – em muitos casos, folhas relativamente finas de células

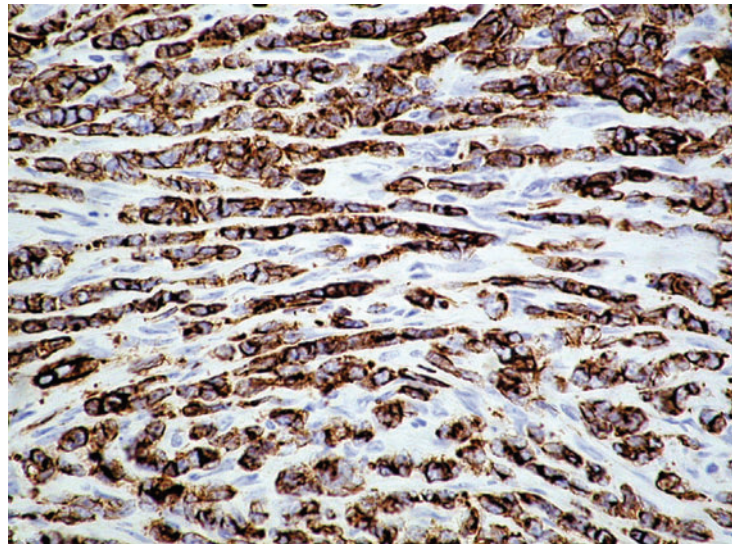


epiteliais situadas sobre profundas e complexas camadas de estroma. Separando as duas, está o tipo especializado de matriz extracelular (ECM) conhecido como membrana basal (veja as Figuras 2.3 e 13.5). Essa matriz é constituída por proteínas secretadas por células epiteliais e células do estroma.

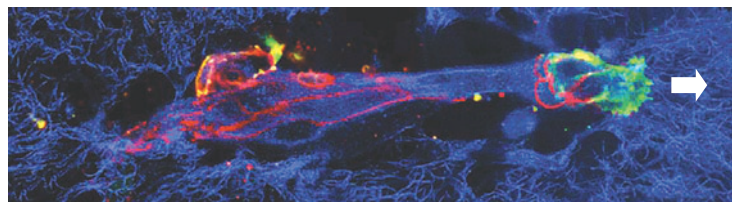
Por definição, carcinomas começam no lado epitelial da membrana basal e são considerados *benignos* enquanto as células que os formam permanecerem nesse lado. Cedo ou tarde, entretanto, muitos carcinomas adquirem a habilidade de penetrar a membrana basal, e células cancerígenas individuais ou em grupo começam a invadir o estroma próximo (Figura 14.5). Essa massa de células neoplásicas é agora reclassificada como *maligna*. De fato, como mencionado no capítulo anterior, muitos patologistas e cirurgiões reservam a palavra “câncer” para aqueles tumores epiteliais que adquiriram essa capacidade invasiva. Para garantir, essa dissolução da membrana basal pelas células de carcinoma invasoras remove uma importante barreira física para a expansão adicional da população de células tumorais. Além disso, como aprendemos no capítulo anterior, por degradação de vários componentes da membrana basal, células invasivas crescem e sobrevivem com fatores seqüestrados da matriz extracelular especializada.

Lembre que, mesmo antes de as células de carcinoma abrirem uma brecha na membrana basal, elas freqüentemente têm sucesso em estimular angiogênese no lado do estroma da membrana, aparentemente enviando fatores angiogênicos através da barreira porosa para células epiteliais no estroma (veja a Figura 13.39). Entretanto, a invasão através da membrana basal coloca-as em uma posição mais favorável para os passos subseqüentes da cascata invasão-metástase. Uma vez presente no compartimento do estroma, células do carcinoma podem ganhar acesso direto aos vasos sanguíneos e linfáticos (Figura 13.41), os quais são normalmente encontrados apenas no lado do estroma da membrana basal (veja, entretanto, a Barra lateral 14.2). O contato próximo com os capilares fornece às células tumorais acesso a nutrientes e oxigênio carregados pelo sangue. Além

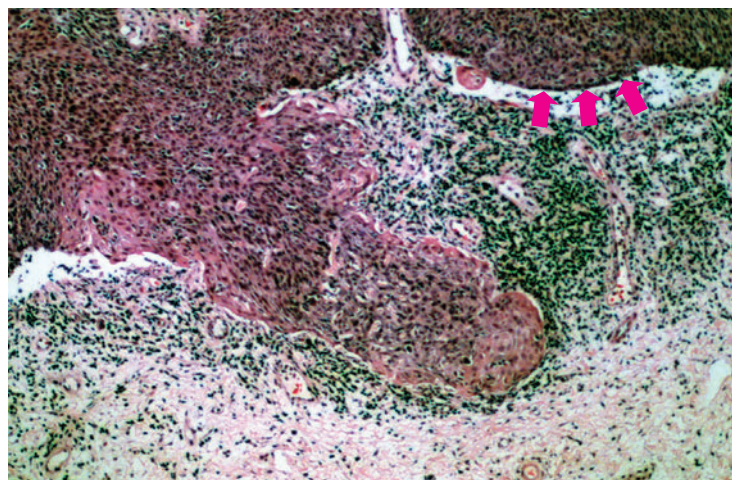
Figura 14.5 Padrões de invasão (A) Estas células invasivas de carcinoma lobular mamário (*marrom*) deixaram o tumor primário (*não-mostrado, à esquerda*) e agora se dirigem à direita uma a uma em fila única, através de canais esculpidos por elas no estroma adjacente. (B) Por outro lado, muito mais típico é o comportamento deste grupo de 5 a 10 células de melanoma, vistas em uma micrografia confocal, as quais se movem juntas através de uma matriz de colágeno (*azul*); como melanócitos normais, eles continuam a aderir-se uns aos outros por meio das junções aderentes formadas por moléculas de E-caderinas (*vermelho*). Grandes intervalos na matriz (*preto*) indicam áreas que foram degradadas pelo avanço de células do câncer. Na principal frente invasiva (*seta branca*), células de melanoma expressam integrinas $\beta 1$ (*verde*), que permitem a essas células ligarem-se à matriz extracelular acima delas. (C) Em uma escala muito maior, cada invasão coordenada é refletida por células neste carcinoma escamoso de cérvix, no qual grandes dedos ou línguas de muitas centenas de células de câncer (*rosa, marrom*) romperam a membrana basal e estão invadindo o estroma. O último sendo caracterizado por fibroblastos do estroma e células inflamatórias (*verde-escuro*). A membrana basal é vista aqui como uma linha horizontal marrom-escuro (*setas rosa, acima à direita*) que separa as células de carcinoma das células do estroma (*abaixo*) e não é interrompida, exceto por capilares e pela língua de células de câncer invasivas. (A, cortesia de J. Jonkers; B, de P. Friedl, Y. Hegerfeldt e M. Tusch, *Int. J. Dev. Biol.* 48: 441-449, 2004; C, cortesia de T.A. Ince.)



(A)



(B)



(C)

disso, suas propriedades invasivas capacitam essas células de câncer a se moverem através das paredes e para dentro dos lúmens (i. e., espaços) dos vasos sanguíneos e linfáticos. A invasão dos vasos é freqüentemente chamada **intravasão**.

Uma vez que tenham chegado ao lúmen dos vasos sanguíneos e linfáticos, células de câncer individuais podem viajar com o sangue ou linfa para outras áreas do corpo. Essas migrações de longo alcance são repletas de grande perigo. Como células normais, as células de câncer continuam a depender de fixação em substratos sólidos; sem esse ancoramento, as células migratórias poderiam morrer rapidamente de *anoikis*, a forma de apoptose que é disparada pela liberação da célula do substrato sólido como a matriz extracelular (Seções 5.8 e 9.13). Como seus ancestrais no tumor primário, esses pioneiros podem depender de vários tipos de suporte do estroma, os quais poderiam faltar no momento em que eles deixam a massa de tumor primário. Lembre que o estroma pode beneficiar células do carcinoma de múltiplas formas, fornecendo fatores mitogênicos e tróficos (sobrevivência).

O sangue representa um ambiente ativamente hostil para células de câncer em metástase. Forças hidrodinâmicas da circulação, as quais são frequentemente substanciais em vasos menores, poderiam interromper a viagem das células de câncer. Alguns modelos experimentais de metástase em camundongos indicam que a sobrevivência de células de câncer em metástase na circulação geral é muito aumentada se elas podem atrair um séquito de plaquetas para acompanhá-las em locais seguros dentro de tecidos.

Se células em metástase sobrevivem a esses danos iniciais e têm acesso aos grandes vasos do sistema venoso, elas viajarão no sangue até o coração e se alojarão, com alta probabilidade, no primeiro conjunto de capilares que encontrarem e, depois da sua passagem inicial através do coração, têm alta probabilidade de chegarem aos capilares-base do pulmão (Figura 14.6). Ao contrário das células vermelhas e brancas do sangue, células do carcinoma são inapropriadas para passarem através de muitos capilares, cujos diâmetros internos são extremamente pequenos para acomodá-las. Capilares em geral têm entre 3 e 8 μm , e células do sangue são bem adaptadas para passarem através desses capilares. Eritrócitos, por exemplo, têm em torno de 7 μm de diâmetro e são facilmente deformáveis, facilitando sua passagem através dos capilares (Figura 14.7). Muitas células de câncer, em contraste, possuem um diâmetro maior do que 20 μm , e não são especialmente deformáveis. (Além disso, se células do câncer no sangue são cobertas por plaquetas, seus diâmetros são efetivamente aumentados, ocorrendo um bloqueio dos vasos mais largos do que capilares, isto é, pequenas artérias chamadas **arteríolas**.)

Uma vez bloqueadas dentro dos pulmões, algumas células circulantes do câncer poderiam desenvolver metástase. Entretanto, muitos tipos de metástase de tumores humanos são encontrados em diferentes lugares do corpo, indicando que frequentemente células de câncer têm sucesso em escapar dos pulmões e viajam para muitos outros lugares do corpo – permanecendo por ser esclarecida a forma como isso ocorre. Em alguns experimentos, células de câncer bloqueadas em capilares têm sido observadas por perderem grandes quantidades de

Barra lateral 14.2 Células de câncer normalmente invadem como um grupo unificado A linguagem usada aqui e em outros textos para descrever invasividade às células de câncer, atribui tal propriedade a células individuais que se aventuram fora do perímetro do tumor primário, fazendo seu caminho na vizinhança do estroma e, finalmente intravasando. De fato, existem tipos de câncer – por exemplo, carcinomas invasivos lobulares de mama (veja a Figura 14.5A) – nos quais células de câncer individuais deixam a massa tumoral uma por uma e procedem em uma fila única (alguma vez chamada “fila indiana”) através de canais formados nas proximidades do estroma. Entretanto, um comportamento muito mais característico das células de carcinoma invasivas está mostrado na Figura 14.5C, na qual um grupo bem-organizado dessas células invade as proximidades do estroma. Como será visto mais adiante neste capítulo, células de carcinoma em contato direto com o estroma poderiam abrir caminho para outras células que as seguiriam. Mais cedo ou mais tarde, entretanto, essas línguas invasivas aproximam-se da musculatura vascular, e qualquer intravasão que ocorra deve depender da habilidade individual da célula de câncer ou pequenas massas dessas células em romperem seus vizinhos neoplásicos e entrarem na circulação.

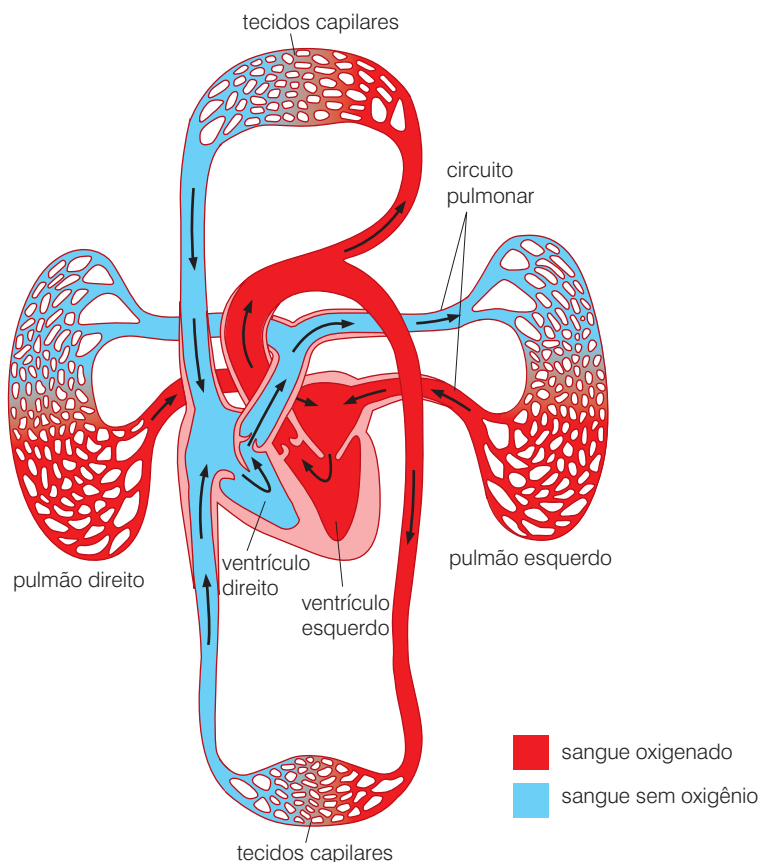
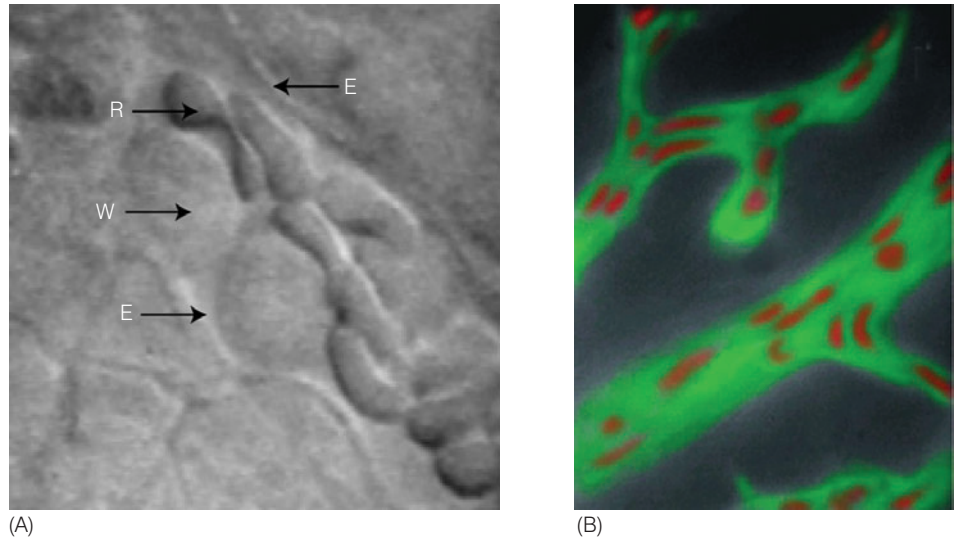


Figura 14.6 Principais rotas da circulação do sangue através do corpo Este diagrama esquemático da circulação da classe dos mamíferos indica que o sangue venoso (azul) deixando o tecido (e então células de câncer que tenham escapado do tumor primário e tenham feito intravasão) deve primeiro passar através do ventrículo direito do coração e, então, através dos pulmões ao ventrículo esquerdo, onde é bombeado para a circulação geral arterial. Essa passagem através da circulação pulmonar requer passagem através dos capilares pulmonares, e quase todas as células em metástase que entram na circulação venosa são rapidamente presas a esses capilares. (De P.H. Raven, G.B. Johnson, S. Singer et al., *Biology*, 7ª ed. Nova Iorque: McGraw-Hill, 2005.)

Figura 14.7 Passagem através dos capilares (A) Microscopia *intravital* revelando as duas paredes de um capilar (E), eritrócitos (R) e alguns leucócitos (W). O pequeno tamanho e a plasticidade dessas células permitem que elas passem pelos capilares sem ficarem presas. (B) Os vasos nesta micrografia de fluorescência *intravital* são um pouco maiores do que os capilares. O plasma foi corado com um corante verde, enquanto os eritrócitos foram corados em vermelho. A alta plasticidade dessas células vermelhas do sangue é aparente. Já que muitas células de câncer têm mais de duas vezes o diâmetro dos eritrócitos e não são deformáveis, elas não são capazes de passarem através dos lúmens de capilares. (De I.C. MacDonald, A.C. Groom e A.F. Chambers, *BioEssays* 24: 885-893, 2002.)



citoplasma, tornando-se células que, embora muito reduzidas em tamanho, parecem ser viáveis; uma vez que elas tenham sofrido essa amputação, cada célula “magra” pode ter êxito em passar através dos estreitos capilares pulmonares. Uma explicação plausível é a de que as células de câncer migratórias possam evitar ser totalmente bloqueadas: em muitos órgãos, incluindo o pulmão, células em metástase podem passar capilares por meio de desvios arteriais-venosos, os quais formam grandes poros, conexões diretas entre as duas partes do sistema circulatório.

Tendo conseguido passar através dos pulmões e chegar à circulação arterial geral (veja a Figura 14.6), células de câncer migratórias podem então se espalhar por todos os tecidos do corpo. Alguns experimentos sugerem que células de câncer usam receptores de superfície celular específicos, como integrinas, para inicialmente se aderirem às paredes do lúmen de arteríolas e capilares de certos tecidos. De qualquer modo, evidências indicam que o simples bloqueio físico dentro dos pequenos vasos, como discutido anteriormente, no contexto do pulmão, permite o espalhamento de muitas células de câncer com seu primeiro apoio dentro de um tecido.

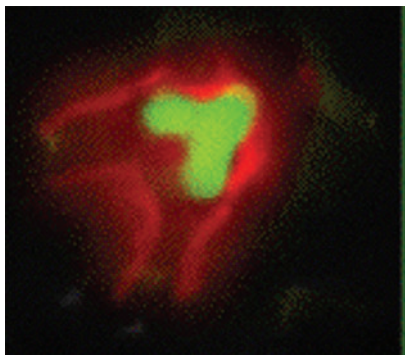


Figura 14.8 Células de câncer crescendo no lúmen de microvasos Microscopia confocal mostrando uma colônia de células de fibrossarcoma de ratos, que expressam uma proteína verde fluorescente (GFP), proliferando dentro de uma arteríola cujas paredes (vermelho) são marcadas por meio do uso de um corante que se liga à lipoproteína de baixa densidade (LDL). (LDL liga-se ao receptor de LDL mostrado nas superfícies luminiais das células endoteliais.) Estas células foram visualizadas cinco dias após células únicas serem introduzidas na circulação venosa de camundongos. (Cortesia de R.J. Muschel.)

Uma vez alojadas em vasos sanguíneos de vários tecidos, células de câncer devem escapar do lúmen desses vasos e penetrar nos tecidos que os rodeiam – o passo chamado **extravasação**. O processo de extravasação depende de interações complexas entre células de câncer e paredes dos vasos aos quais elas se tornaram presas. Células de câncer podem usar várias estratégias alternativas para extravasar. Elas podem começar proliferando dentro do lúmen dos vasos, criando um pequeno tumor que cresce e, por fim, destrói a parede do vaso adjacente (Figuras 14.8 e 14.9). Fazendo isso, elas empurram células endoteliais do lado, perícitos e células de músculo liso que previamente separavam o lúmen do vaso do tecido que o circunda, sendo mais tarde chamado de *parênquima*. Alternativamente, células de câncer podem proceder imediatamente a atalhar o seu caminho através da parede do vaso. Sua habilidade em fazê-lo pode depender de alguns mecanismos bioquímicos e biocelulares que permitem que elas ou seus ancestrais imediatos invadam do tumor primário e intravasem (veja a Barra lateral 14.3).

14.2 A colonização representa o passo mais complexo e desafiador da cascata invasão-metástase

Uma vez que tenham chegado dentro do parênquima de um tecido, células de câncer em metástase podem começar a formar uma massa tumoral nos seus novos locais encontra-

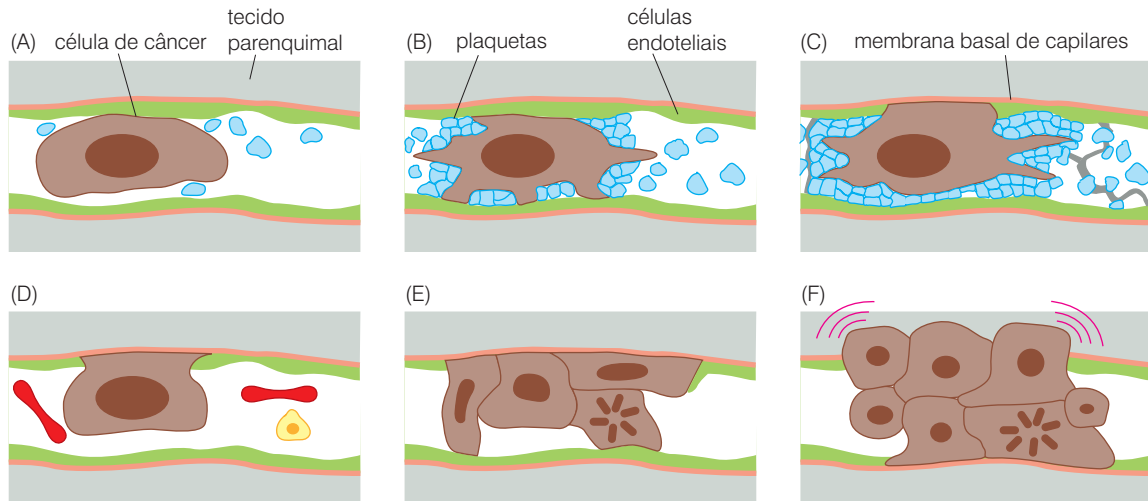


Figura 14.9 Passos levando à extravasação Observações em microscopia eletrônica de células de câncer de pulmão em metástase injetadas na circulação venosa de camundongos têm sugerido que o processo de extravasação freqüentemente procede na seguinte seqüência de passos. (A) Células em metástase (citoplasma marrom-claro, núcleo marrom-escuro) ficam presas fisicamente ao capilar. (B) Em minutos, um grande número de plaquetas (azul) se tornou ligado a essas células de câncer, formando um microtrombo. Algumas dessas ainda não desgranularam ou liberaram fatores de crescimento, proteases, etc. (C) Células de câncer empurram para o lado células endoteliais

(verde) em uma parede de capilar, conseqüentemente alcançando contato direto com a base da membrana basal do capilar (laranja). (D) Em um dia, o microtrombo é dissolvido pelas proteases do sangue que são geralmente responsáveis por dissolverem coágulos. (E) Células de câncer começam a proliferar no lúmen do capilar. (F) Dentro de alguns dias, algumas vezes cedo, células de câncer rompem a membrana basal do capilar e invadem tecido parenquimal que as cercam (área cinza). (Note que, neste cenário, os microtrombos são formados apenas *depois* que células de câncer se tornaram presas no capilar.) (De J.D. Crissman, J.S. Hatfield, D.G. Menter et al., *Cancer Res.* 48: 4065-4072, 1988.)

dos, o processo freqüentemente chamado de **colonização**. Esse passo é também um desafio – talvez o mais difícil de todos, ostensivamente porque o ambiente do tecido estranho não dá às células de câncer fatores de crescimento e sobrevivência familiares que permitem a seus progenitores crescer no tumor primário. Sem esses diferentes tipos de suporte fisiológico, células em metástase podem rapidamente morrer ou, quando muito, sobreviver por longos períodos como células únicas ou pequenos grupos de células de câncer – então chamadas micrometástases – que podem apenas ser detectadas microscopicamente e raramente aumentam de tamanho. Em geral, o número de micrometástases no corpo do paciente com câncer excede muito aquele que cresceria o suficiente (vários milímetros ou mais em diâmetro) para ser clinicamente detectável. Essas micrometástases poderiam ser muito disseminadas através dos tecidos do paciente com câncer, algumas vezes levando a resultados desastrosos.

Barra lateral 14.3 Células de câncer são **concorcionistas atrapalhadas** A complexa tarefa de escapar da circulação para o tecido parenquimal adjacente é rotineiramente completada por leucócitos, que precisam ser hábeis em entrar no parênquima em resposta a certos estímulos inflamatórios, incluindo a presença de agentes infecciosos. Por meio de uma seqüência de passos conhecida como **diapedese**, leucócitos são hábeis em induzir células endoteliais em vênulas pós-capilares a se retraírem, abrindo, assim, um portal no tecido

base. O processo inteiro de ligação à parede endotelial para entrada no tecido parenquimal leva menos de um minuto e envolve um programa coreografado elaborado de trocas bioquímicas e celulares!

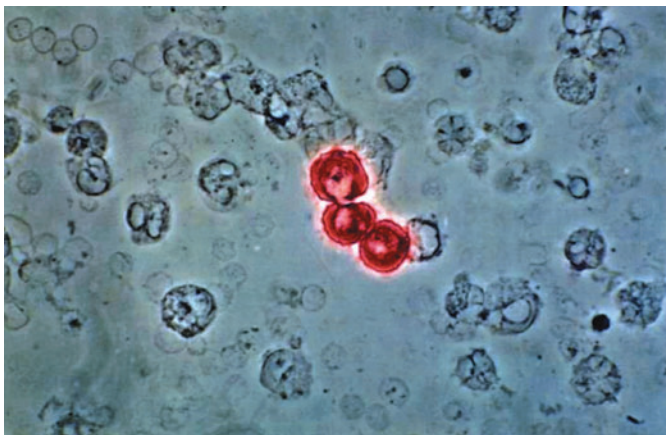
Em contraste, a grande maioria de células em metástase não é favorecida por receptores e mecanismos de respostas bioquímicas para executar a diapedese. Conseqüentemente, se células neoplásicas têm sucesso em penetrar através da parede de capilares ou vasos, elas parecem fazê-lo pela força bruta, talvez degradando partes do endoté-

lio em um processo que requer muitas horas, até mesmo um dia, mais do que um minuto para completá-lo. De adicional interesse aqui é o fato de que a trombina produzida durante a formação de microtrombos é absolutamente efetiva em clivar várias proteínas usadas por células endoteliais para ligarem-se à membrana basal vascular; isso poderia causar o retraimento das células endoteliais dos microêmbolos, dessa forma expondo a membrana basal do capilar ao ataque direto por células de câncer e proteases geradas por elas.

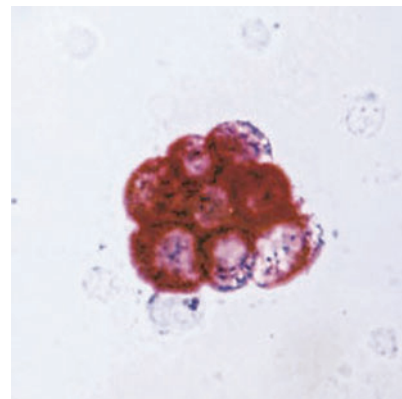
Anticorpos reativos com **citoqueratinas** são usados para detecção de micrometástase em carcinomas primários que se espalham em medulas ósseas e sangue, enquanto um anticorpo contra uma molécula de adesão da célula epitelial (EpCAM) é frequentemente usado para detectar micrometástase em linfonodos. Em todos esses casos, a presença de células citoqueratina positivas isoladas (e portanto epiteliais) em tecidos por outro lado completamente mesenquimais representa um claro sinal de que o início de metástase ocorreu. Técnicas microscópicas atuais usando anticorpos específicos para citoqueratina permitem a detecção de uma única célula em metástase entre 10^5 ou até mesmo 10^6 células mesenquimais no sangue, na medula óssea ou nos linfonodos (Figura 14.10).

Muitos dos passos não progridem eficientemente, e a probabilidade de uma célula individual completar essas etapas com sucesso é muito baixa. Por exemplo, em alguns camundongos com tumores primários de cerca de 1 g de massa ($\sim 10^9$ células), cerca de um milhão de células podem ser disseminadas na circulação cada dia, ainda que metástases visíveis formadas em cada animal possam ser contadas nos dedos de uma mão.

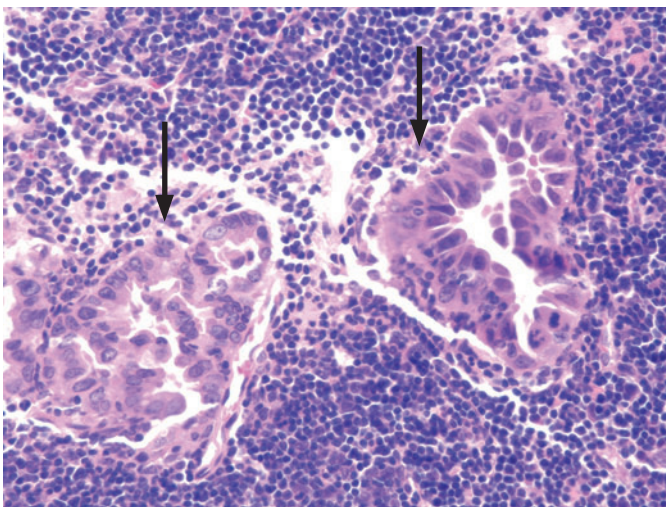
Essa baixa taxa de sucesso na formação de metástases, algumas vezes chamada de *ineficiência metastática*, é o produto final da seqüência de passos ineficientes que, juntos, formam a cascata invasão-metástase. Alguns experimentos indicam que passos iniciais nessa cascata são executados bastante eficientemente por células em metástase, enquanto passos tardios, envolvendo colonização, ocorrem apenas raramente e, por isso, são a medida *limite* determinante do processo como um todo. Conseqüentemente, um grande



(A)



(B)



(C)

Figura 14.10 Detecção de micrometástase em linfonodos e medula (A) A presença de células em metástase na medula óssea é geralmente analisada pela retirada da medula da crista ilíaca da pélvis. Nesta micrografia, a presença de micrometástases contendo muitas células de câncer na medula óssea de pacientes com câncer de cólon têm sido detectada por coloração com um anticorpo antiqueratina. (B) Essencialmente, imagens idênticas podem ser detectadas em medula óssea extraída em pacientes com câncer de mama. Neste caso, um conjunto de oito células de carcinoma mamário, visto a um aumento um pouco mais baixo, formam uma micrometástase. (C) A presença de micrometástases em um linfonodo é indicada pelo seu aspecto, que contrasta fortemente com aqueles linfócitos adjacentes. Aqui duas metástases de um adenocarcinoma de pulmão em camundongo (setas) em um linfonodo são vistas no meio de um mar de linfócitos. Note a formação de uma estrutura do tipo de um ducto pela micrometástase da direita. (A, cortesia de I. Funke e G. Riethmüller; B, de S. Braun, K. Pantel, P. Muller et al., *N. Engl. J. Med.* 342: 525-533, 2000; C, cortesia de K.P. Olive e T. Jacks.)

número de micrometástases pode ser disseminado através do corpo, e muitas poderiam persistir por longos períodos antes que um ou outro desses migrantes ou seus descendentes finalmente adquiram a habilidade de crescer como uma massa clinicamente detectável (Barra lateral 14.4).

Com base na existência de micrometástases dormentes, que persistem nesse estado (sem crescer) por longos períodos, observou-se, em experimentos nos quais células de câncer foram inicialmente marcadas por breve exposição a partículas contendo fluorescência, que essa fluorescência persistia por períodos extensos dentro da célula, mas não afetava sua viabilidade. Seguindo essa marcação, a concentração intracelular – intensidade da fluorescência das partículas mortas – diminuiu em um fator de 2 a cada divisão celular; além disso, a intensidade da fluorescência residual em células após um período extenso permitiu estimar quantas divisões celulares ocorreram desde a marcação inicial.

Tais células de câncer marcadas foram introduzidas via circulação porta em camundongos vivos, nos quais elas formaram grande número de micrometástase de célula única. Onze semanas mais tarde, células de câncer foram recuperadas desses camundongos, e muitas delas ainda possuíam intensidade de fluorescência completa (Figura 14.12), indicando que elas não se dividiram mesmo uma única vez desde que chegaram nos camundongos. As células de câncer recuperadas permaneceram capazes de proliferarem *in vitro* e foram hábeis em formar novos tumores quando injetadas subcutaneamente em outros camundongos.

Esse experimento mostra que células de câncer em metástase dramaticamente permanecem viáveis por longos períodos em um estado dormente sem divisão, dentro de tecidos diferentes. (Note que diferentes tipos de micrometástases aparecem quando células de câncer disseminadas conseguem proliferar e formar colônias de muito pequeno tamanho dentro de tecidos diferentes; de qualquer forma, essas micrometástases nunca aumentam em tamanho, já que a velocidade de proliferação nessas massas é contrabalanceada por uma igual velocidade de apoptose, talvez por causa do fracasso dessas células em executar angiogênese. (Veja a Seção 13.7.) Qualquer que seja sua natureza, micrometástases representam um perigo iminente, já que com frequência estão presentes em um grande número por todo o corpo e poderiam irromper anos após o câncer ser descoberto e curado.

Em resumo, múltiplos passos da cascata invasão-metástase compreendem tantas trocas biológicas distintas quanto todos os passos que precedem essa cascata durante o curso da formação do tumor primário. A complexidade dessa cascata, como descrita nessas duas seções, levanta questões que poderiam motivar muitas das nossas próximas discussões deste capítulo: como células de câncer aprendem a se tornar metastáticas? Cada passo dessa cascata requer a ação de genes específicos que se tornam alterados durante a progressão do tumor? Ou são muitos dos passos individuais da invasão e metástase orquestrados por um único gene principal controlador ou um pequeno grupo desses genes?

Também abordaremos um outro simples mas profundamente importante ponto: células altamente malignas carregam genes mutados especializados em induzir invasividade ou metástase? Ou esses passos tardios na progressão tumoral dependem especificamente da ação de oncogenes e supressores tumorais de genes que temos encontrado repetidamente neste livro?

14.3 A transição epitelial-mesenquimal e a perda associada da expressão de E-caderina permite que células de carcinoma tornem-se invasivas

O primeiro de muitos passos que levam à metástase – a aquisição do local de invasão – envolve as mais importantes trocas no fenótipo de células do câncer dentro do tumor primário. Como antes, iremos focar esta discussão em tecidos epiteliais e carcinomas que

Barra lateral 14.4 Análises genéticas sugerem que a habilidade de desenvolver metástase pode ocorrer fora do tumor primário Em talvez 30% dos pacientes com câncer de mama, próstata e cólon, cujos carcinomas primários tenham sido removidos por cirurgia, possam ser detectadas micrometástases na medula, nos linfonodos ou no sangue; esses pacientes são considerados como tendo “doença residual mínima”. Nesse estágio, análises genéticas das micrometástases indicam que elas são geneticamente heterogêneas. Entretanto, anos mais tarde, quando o paciente tem recidiva da doença e manifesta rapidamente massas metastáticas detectáveis, células únicas de micrometástases desses pacientes apresentam maior similaridade genética (Figura 14.11A).

Isso sugere um estágio da progressão tumoral na qual a habilidade em formar colônias é adquirida separadamente da habilidade em disseminar para órgãos distantes. Inicialmente, células de câncer geneticamente diversas são distribuídas por um tumor primário através do corpo, mas nenhuma delas tem sucesso em estabelecer-se como uma metástase macroscópica, simplesmente porque nenhuma delas

é capaz de fazê-lo. Depois de um período, entretanto, a evolução genética ocorre em algumas micrometástases, com a produção de clones de células com novas características adquiridas e habilidade em colonizar eficientemente. À medida que esse clone se expande, células de câncer começam a disseminar-se através do corpo, gerando então uma nova, segunda onda de disseminação metastática. Células individuais que são liberadas por esse clone logo constituem a maioria das micrometástases de células únicas na medula de pacientes, e essas micrometástases são geneticamente muito similares, porque descendem da mesma população de células clonais. De forma importante, todas as células dessas novas micrometástases adquiriram a habilidade em colonizar, muitas tornando-se rapidamente metástases macroscópicas e um risco de vida para os pacientes. Esse modelo (Figura 14.11B) sugere que a evolução que avança na direção da malignidade frequentemente ocorre em locais anatómicos distantes do tumor primário removido. Apesar do sugerido por essas observações, o esquema da Figura 14.11B não é ainda validado por grandes e estatisticamente robustos conjuntos de observações.

Figura 14.11 Heterogeneidade genética de micrometástases e a evolução da habilidade de colonizar (A) Micrometástases de células únicas de carcinomas primários podem ser identificadas em biópsias de medula devido à exibição de marcadores de células epiteliais, como citoqueratinas ou EpCAM (veja a Figura 14.10), e então isoladas usando-se micropipetas. (B) A adaptação da hibridização genômica comparativa (CGH; veja a Figura 11.20) é usada para analisar células micrometastáticas individuais para o ganho ou perda de vários braços cromossômicos. Isso tem possibilitado relacionar resultados de “perfil genético” de cada micrometástase com o perfil de muitas outras micrometástases isoladas do mesmo paciente. Esses perfis são agrupados por similaridade em *dendogramas*; ao contrário, aqueles que possuem perfis genéticos muito diferentes são localizados distantes nas ramificações desse dendograma. No evento em que múltiplas micrometástases de um paciente único são agrupadas perto, uma com outra na ramificação do dendograma (sendo então fortemente relacionadas geneticamente), isso está indicado por uma *barra horizontal azul* associada a esse par ou a um grande grupo de micrometástases. Micrometástases na medula de pacientes (identificadas por *sondas*) com tumores de mama, próstata e colorretal foram obtidas no momento da remoção cirúrgica de seus tumores primários, o estágio chamado “doença residual mínima”. Como visto no dendograma superior, apenas a minoria de micrometástases em pacientes com a doença residual mínima é agrupada no dendograma, indicando substancial heterogeneidade genética de micrometástases dentro de cada paciente nesse estágio da doença. Entretanto, meses ou anos mais tarde, quando há recidiva da doença com a ocorrência de metástase macroscópica, muitas micrometástases detectadas em quase todos os pacientes são localizadas próximas umas das outras no dendograma inferior, indicando uma forte correlação genética. (C) A análise mostrada no painel (B) sugere o seguinte modelo. Uma população de células do tumor primário geneticamente heterogênea inicialmente formada (veja a Figura 11.18) dissemina micrometástases igualmente heterogêneas através do corpo do paciente com câncer. O tumor primário é então removido cirurgicamente, deixando para trás apenas micrometástases e criando o estágio da doença residual mínima. Após um período de anos, em um ou outro local do corpo, um desses clones celulares micrometastáticos (*verde-claro*) adquire a habilidade de colonizar, isto é, tornar-se uma metástase macroscópica. Esta atua como fonte de células que geram uma nova cascata de disseminação metastática através do corpo. Devido a essas novas células dispersas que compartilham uma origem clonal comum, as micrometástases formadas a partir delas são geneticamente muito similares. Além disso, as células em cada uma dessas micrometástases secundárias são favorecidas com a habilidade de colonizar (já que todas derivam de um clone celular de micrometástase que previamente adquiriu essa habilidade), muitas delas podendo crescer rapidamente, tornando-se macroscópicas, clinicamente detectáveis, que resultam em recidiva da doença. (A e B, de C.A. Klein, T.J. Blankenstein, O. Schmidt-Kittler et al., *Lancet* 360: 683-689, 2002.)

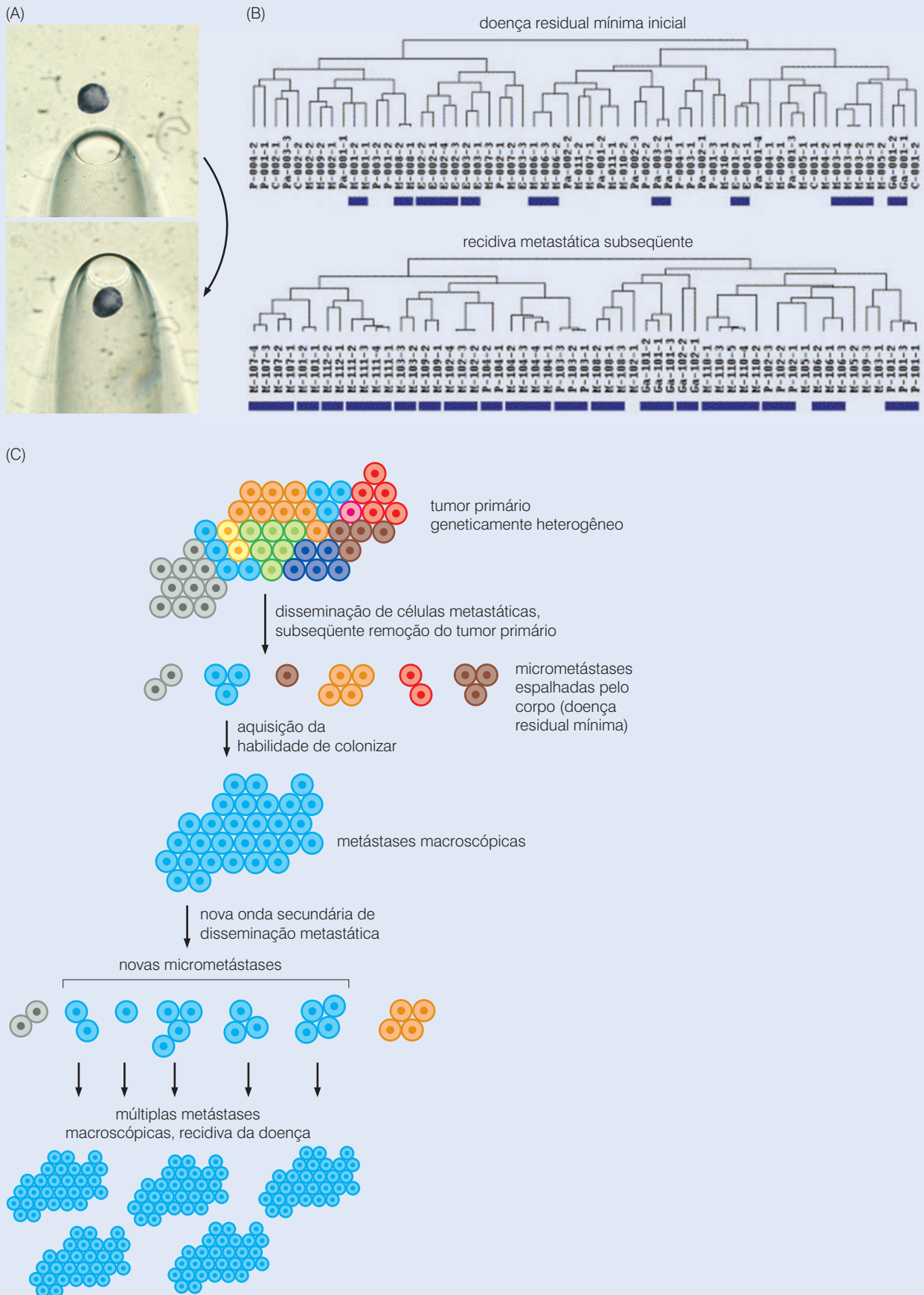
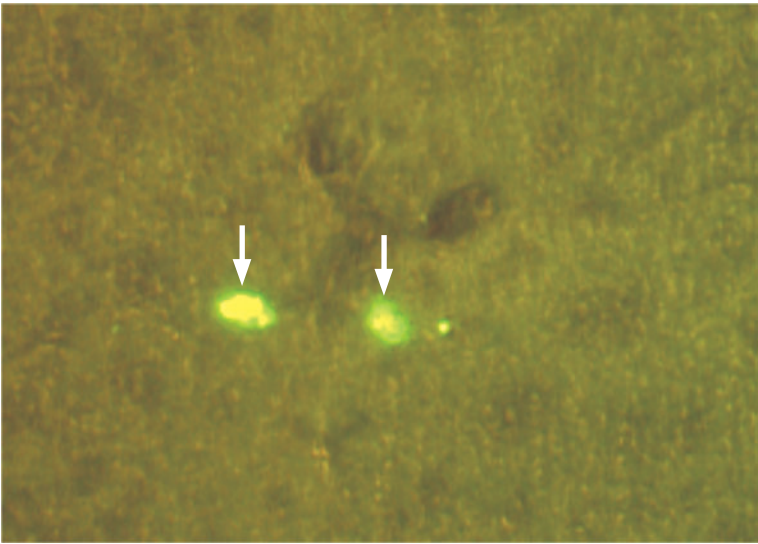


Figura 14.12 Persistência de células tumorais solitárias dormentes muitas semanas depois da introdução no fígado. Células de câncer de mama de camundongo tumorigênico foram marcadas pela indução da captura de nanopartículas de estireno (48 nm de diâmetro) coradas com fluorescência. Essas células foram injetadas na veia mesentérica, que as transporta até o fígado, via veia porta. Após 11 semanas, células tumorais puderam ainda ser detectadas no fígado (setas brancas). Significativamente, a intensidade de fluorescência de muitas dessas células não mostrou diferenças quando comparadas com células recém-marcadas, indicando que elas não se dividiram nem mesmo uma vez depois da marcação. Os descendentes de muitas dessas células que foram isoladas e cultivadas *in vitro* foram tumorigênicos, isto é, capazes de formar tumor quando injetados nas camadas de gordura mamárias de camundongos. (Além disso, células de câncer dormentes foram encontradas por serem totalmente resistentes à quimioterapia, que reduziu em até 75% o tamanho de metástases que cresceram rapidamente nos mesmos camundongos.) (De G.N. Naumov, I.C. MacDonald, P.M. Weinmeister et al., *Cancer Res.* 62: 2162-2168, 2002.)



eles disseminam. A organização das camadas das células epiteliais em tecidos normais é incompatível com a mobilidade e a invasividade apresentadas por células de carcinoma, ainda que esse plano de organização epitelial continue a ser respeitado em muitos carcinomas primários. Nestes tumores, lâminas bem-organizadas de células epiteliais estão presentes, embora sua topologia seja bastante diferente das de células de epitélio normal (veja, por exemplo, a Figura 2.6).

Com o objetivo de adquirir mobilidade e invasividade, células de carcinoma devem alterar muito o seu fenótipo epitelial, destacando-se das camadas epiteliais, e sofrer uma drástica mudança – a transição epitelial-mesenquimal (EMT), mencionada no contexto de cicatrização de ferimentos (Seção 13.3). Lembre que EMT causa a perda por células epiteliais das suas características morfológicas e do padrão de expressão gênica e a hipótese da forma e programa transcricional característicos das células mesenquimais. Essa principal troca no fenótipo nas células epiteliais é necessária para a reconstrução das camadas epiteliais após o ferimento (veja a Figura 13.13C). EMT é usada amplamente em certos passos morfogênicos ocorrendo durante a embriogênese, quando o remodelamento dos tecidos depende de EMT, executado por vários tipos de células epiteliais (Tabela 14.1). É plausível, embora não-comprovado, que todos os tipos de carcinoma sofram uma EMT parcial ou completa, com o objetivo de adquirir mobilidade e invasividade.

Durante um dos passos da **gastrulação** em embriogênese inicial, células individuais destacam-se do ectoderma e migram na direção interna do centro do embrião para formar o mesoderma, precursor dos tecidos mesenquimais, incluindo fibroblastos e células hematopoiéticas (em corda-

Tabela 14.1 Exemplos de EMTs durante o desenvolvimento embrionário de camundongos

Processo	De	Transição Para
Gastrulação	epiblasto	mesoderma
Mesênquima pré-valvular no coração	endotélio	septo ventricular e atrial
Células da crista neural	placa neural	células da crista neural, as quais podem produzir medula, músculo, sistema nervoso periférico
Somitogênese	paredes dos somitos	esclerótomo
Formação do palato	epitélio oral	células mesenquimais
Regressão do ducto de Müllerian	trato de Müllerian	células mesenquimais

Adaptada de P. Savagner, *BioEssays* 23: 912-923, 2001.

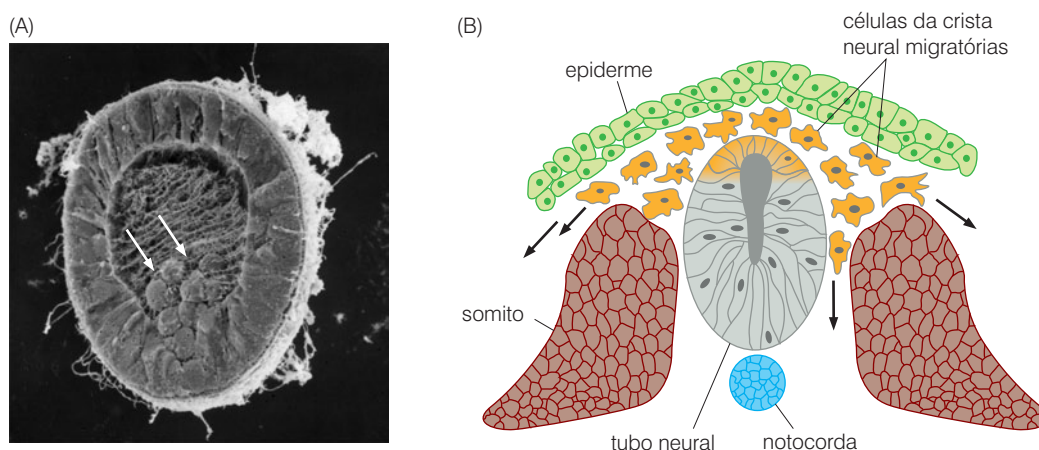


Figura 14.13 Embriogênese e transição epitélio-mesênquimal (EMT) (A) Esta microscopia eletrônica por varredura mostra a descamação das células do ectoderma primitivo de um embrião de ouriço-do-mar (*setas brancas*) e sua migração para o interior do embrião. As células se tornaram arredondadas e adquiriram mobilidade antes da formação dos rudimentos de mesoderma – trocas associadas com a transição epitélio-mesênquimal (EMT). Elas estão migrando ao longo de fitas de matriz extracelular do lúmen do embrião inicial. (B) A descamação das células neuroepiteliais do tubo neural também requer estar sob EMT. Células da crista neural embrionária (*laranja*), as quais derivam da região superior do tubo neural epitelial inicial (*cinza*), descamam deste epitélio, adquirem mobilidade e invasividade e se dispersam através do embrião e, finalmente, através do corpo do organismo resultante, no qual formam melanócitos, muito do sistema nervoso periférico e muito do esqueleto da face. (A, cortesia de G. Cherr; B, de A.E. Vernon e C. LaBonne, Curr. Biol. 14: R719-R721, 2004.)

dos). Essa conversão de células ectodermais, as quais, nesse estágio, são ordenadas em camadas de células epiteliais, naquelas com fenótipo mesodermal, envolve EMT (Figura 14.13A). Ao mesmo tempo, essas células submetidas à EMT adquirem a habilidade de se translocarem de um ponto (camada externa de células) a outro (camada interna) dentro do embrião.

A migração de células neuroepiteliais da crista neural para o mesênquima de embriões iniciais de vertebrados também depende da transformação do fenótipo da célula, que pode ser melhor descrito como uma EMT (Figura 14.13B). Similarmente, a migração de precursores celulares miogênicos (os progenitores de células do músculo) do dermatômio do embrião inicial para a germinação dos membros depende de uma transformação do fenótipo celular do tipo EMT. Todos esses processos, por sua vez, sustentam uma notável semelhança com células em EMT na margem de ferimentos dentro do epitélio; essas células estão sob EMT transiente com o objetivo de migrar para dentro do local do ferimento e fechar espaços nas camadas de células epiteliais criadas pelo processo de ferimento (veja a Figura 13.14).

EMT pode também ser vista na margem de carcinomas que estão invadindo tecidos adjacentes (Figura 14.14). Esse processo patológico é notavelmente similar às EMTs que ocorrem durante a embriogênese inicial e a cicatrização do ferimento. Uma vez ainda, células epiteliais cessam a expressão de proteínas marcadoras epiteliais e expressam proteínas mesenquimais em seu lugar; ao mesmo tempo, tais células perdem sua morfologia epitelial e tomam a aparência de fibroblastos (veja a Figura 13.13).

A forte semelhança entre processos patológicos da invasividade do tumor e passos normais da embriogênese e cicatrização de ferimentos sugere um modelo mecanístico plausível: de acordo com esse modelo, que é sustentado por extensivas evidências reunidas nos últimos anos, o programa complexo de reorganização celular exibido por células do carcinoma invasivas depende da reativação de programas comportamentais latentes cuja expressão em geral é confinada à embriogênese inicial e a tecidos adultos injuriados. De acordo com essa linha de pensamento, uma vez que células do carcinoma adquirem acesso ao programa de EMT, elas podem explorá-lo para mudar profundamente sua própria morfologia, mobilidade e habilidade para invadir camadas de células próximas. Esse modelo implica que múltiplas mudanças no fenótipo celular associadas a invasividade, algumas das quais descritas a seguir, não necessitam ser adquiridas pouco a pouco pelas células do carcinoma. Em vez disso, essas células simplesmente ativam um programa morfogenético que já está codificado nos seus genomas. (Isso logicamente evoca nossa discussão inicial sobre as interações epitélio-estroma, na Seção 13.3, em que questionamos a exploração do programa de cicatrização de ferimento por células de câncer com o objetivo de adquirir um estroma ativado.)

Versões normais e patológicas de EMT envolvem, além das alterações na forma e aquisição de mobilidade, mudanças fundamentais no perfil de expressão gênica das células (Tabela 14.2). A expressão de E-caderina e citoqueratinas – marcadores de células epiteliais – é repri-

mida, enquanto a expressão de **vimentina**, um componente filamentosso intermediário do citoesqueleto de células mesenquimais, é induzida. Células epiteliais que sofreram EMT frequentemente começam a produzir fibronectina, uma proteína da matriz extracelular que é normalmente secretada apenas por células mesenquimais, como os fibroblastos. Ao mesmo tempo, a expressão típica de marcadores fibroblásticos – N-caderina – é frequentemente adquirida no lugar de E-caderina (Figura 14.15).

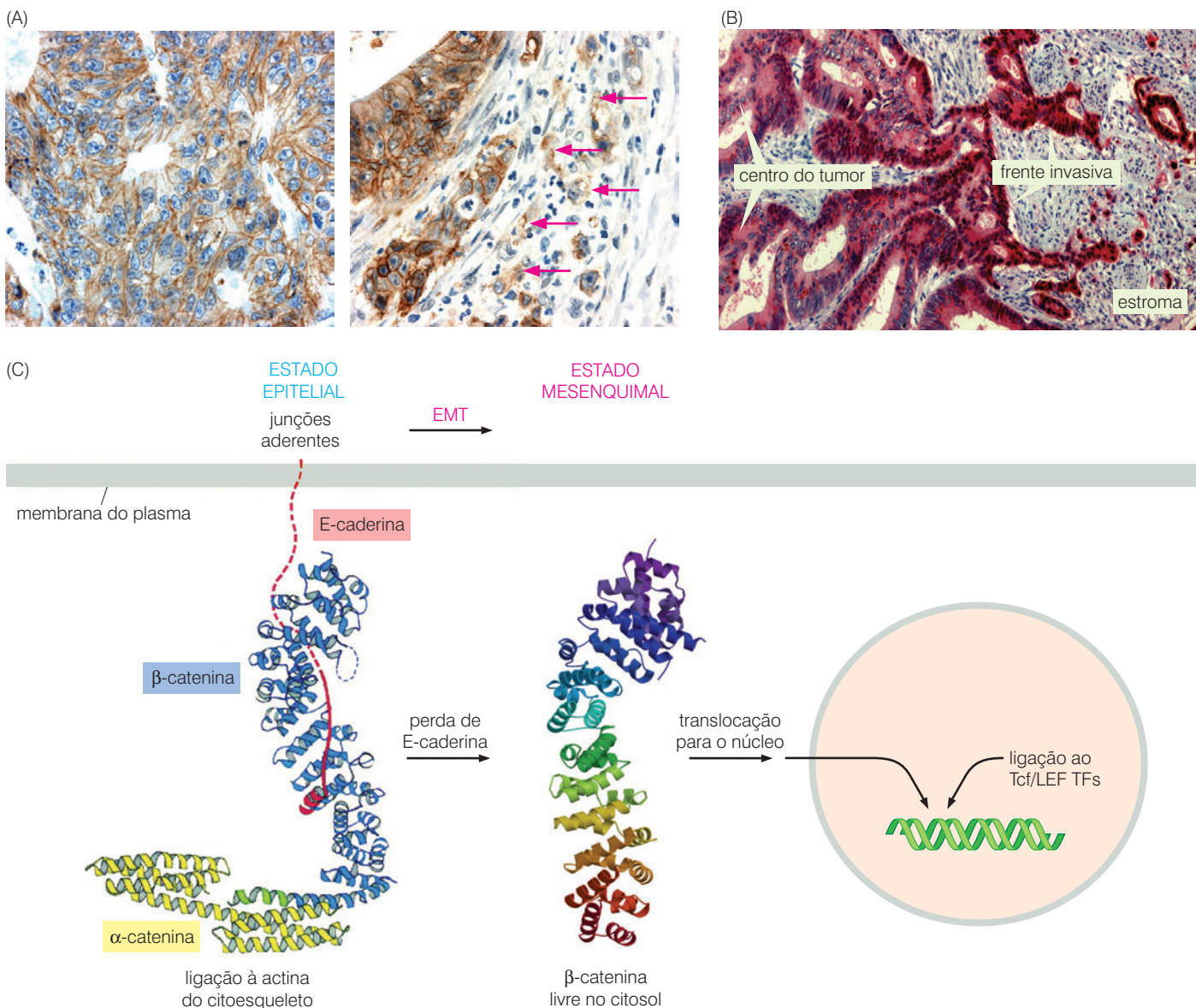


Figura 14.14 Transição epitélio-mesenquimal na margem invasiva do tumor. Células de carcinoma de cólon na margem do tumor humano primário sofrem mudanças na expressão gênica e localização de certas proteínas. (A) Enquanto a E-caderina (marrom) é fortemente expressada na membrana do plasma de células do centro do tumor primário, onde se formam junções aderentes (painel esquerdo), sua expressão diminui substancialmente em células invasivas individuais na margem desse tumor (setas vermelhas, painel direito) localizado próximo da membrana do plasma. (B) Ao mesmo tempo, células no centro do tumor expressam β-catenina (vermelho-escuro, lado esquerdo) abaixo das suas membranas do plasma e de forma difundida pelo citoplasma, enquanto células tumorais na margem mostram intensa coloração para β-catenina nos

seus núcleos (lado direito). (C) Em células epiteliais normais, β-catenina serve para ligar a cauda citoplasmática de E-caderina, que forma junções aderentes com células vizinhas (veja a Figura 13.12), ao esqueleto de actina. Ela também funciona no citoplasma como uma chave intermediária na via de sinalização Wnt (Seção 6.10). A perda de E-caderina da membrana plasmática libera moléculas de β-catenina, as quais poderiam então migrar para o núcleo e associarem-se aos fatores de transcrição Tcf/Lef, consequentemente induzindo a expressão de genes orquestrando o programa de EMT. (A, de T. Brabletz, A. Jung, S. Reu et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 10356-10361, 2001; B, cortesia de T. Brabletz e T. Kirchner; C, de T.A. Graham, C. Weaver, F. Mao et al., *Cell* 103: 885-896, 2000, cortesia de H.-J. Choi e W.L. Weis.)

Tabela 14.2 Trocas celulares associadas a transição epitelial-mesenquimal

Perda de	
Expressão de citoqueratina (filamento intermediário)	
Proteína (E-caderina) das junções aderentes epiteliais	
Polaridade da célula epitelial	
Aquisição de	
Forma semelhante a fibroblasto	
Mobilidade	
Invasividade	
Programa de expressão de genes mesenquimais	
Proteína (N-caderina) das junções aderentes mesenquimais	
Secreção de proteases (MMP-2, MMP-9)	
Expressão de vimentina (filamento intermediário)	
Secreção de fibronectina	
Expressão do receptor PDGF	
Expressão da integrina $\alpha\beta 6$	

De todas essas proteínas, a molécula transmembrana E-caderina tem um papel dominante influenciando o fenótipo em células epiteliais *versus* mesenquimais. Retome nossos primeiros encontros com E-caderina e seu papel na aderência das células epiteliais (veja a Figura 6.26A e 13.12). Em epitélio normal, os ectodômios das moléculas de E-caderina se estendem da membrana plasmática de uma célula epitelial para formar complexos com outras moléculas de E-caderina protundentes da superfície de uma célula epitelial adjacente. Isso permite a formação de pontes homodiméricas (e ordens mais altas) entre células adjacentes de uma camada de células epiteliais, resultando nas junções aderentes que são muito importantes para a integridade estrutural das folhas de células epiteliais.

Os domínios citoplasmáticos de moléculas individuais de E-caderina são conectados às fibras de actina do citoesqueleto via um complexo de α e β -cateninas (veja as Figuras 13.12 e 14.14) e outras proteínas subordinadas. O citoesqueleto de actina, por sua vez, fornece resis-

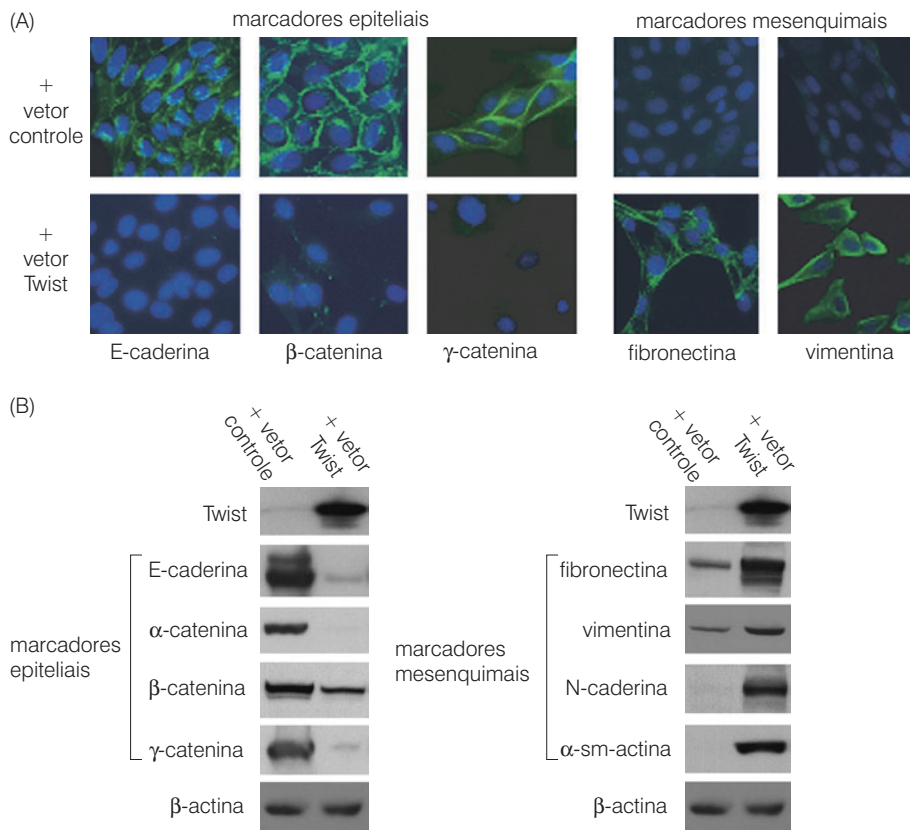


Figura 14.15 Mudanças bioquímicas associadas à EMT Como discutido anteriormente, EMT pode ser induzida por muitos fatores de transcrição. Mostrados aqui estão os efeitos da expressão do fator de transcrição Twist em células MDCK (Maden-Darby canine kidney), as quais são amplamente usadas para estudar a biologia celular do epitélio. (A) Análises imunofluorescentes indicam que a expressão de marcadores epiteliais, especificamente E-caderina, β -catenina e γ -catenina, é reprimida, enquanto a expressão de marcadores mesenquimais, especificamente vimentina e fibronectina, é induzida pela expressão ectópica de Twist. (B) *Immunoblots* confirmam os resultados de imunofluorescência, de uma forma mais quantitativa. Lisados de células-controle são analisados na *coluna esquerda*, enquanto lisados de células MDCK, forçadas a expressarem Twist, são analisados na *coluna direita*. β -actina, cuja expressão não é afetada por EMT, é usada aqui como um controle para assegurar que iguais quantidades de lisado celular foram usados para análise em todos os casos. Sm-actina, α -actina de músculo liso. (A e B, de J. Yang, S.A. Mani, J.L. Donaher et al., *Cell* 117:927-939, 2004.)

tência para a célula. Ainda, unindo-se a citoesqueletos de actina de células adjacentes, moléculas de E-caderina auxiliam uma camada de células epiteliais a resistirem a forças mecânicas que poderiam rompê-la. Uma vez que a expressão de E-caderina é suprimida, muitas das outras mudanças fisiológicas celulares associadas a EMT parecem seguir o processo. Alguns experimentos indicam que a simples supressão da expressão da proteína E-caderina faz com que a célula adquira morfologia mesenquimal e aumento da mobilidade.

O papel essencial de E-caderina na aquisição de fenótipos celulares malignos é também sustentado por observações indicando que o gene *CDH1*, que codifica para E-caderina, é reprimido por metilação no promotor em muitos tipos de carcinomas humanos invasivos (veja a Tabela 7.2) e, em outros, por certos repressores transcricionais; esse gene pode também ser inativado por mutações alterando a fase de leitura. Por exemplo, uma análise de 26 linhagens de células de câncer de mama humanas indica que oito têm mutações que levaram à inativação da expressão do gene de E-caderina, cinco tiveram mutações gerando proteínas truncadas, enquanto três tiveram deleções resultando na expressão de moléculas de E-caderina mutantes na superfície celular. Até agora, a perda da expressão de E-caderina ou a expressão de proteínas mutantes tem sido documentada em carcinomas avançados de mama, cólon, próstata, estômago, fígado, esôfago, pele, rins e pulmão. Mutações nos alelos da linha germinativa do gene *CDH1* resultam em câncer gástrico familiar (veja a Tabela 7.1).

Em estudos adicionais de muitos tipos de células de carcinomas que perderam a expressão de E-caderina, a reexpressão dessa proteína (feita experimentalmente pela introdução de um vetor contendo E-caderina) suprime muito a invasividade e a disseminação de metástase nessas células cancerosas. Ao mesmo tempo, essas diversas observações indicam que os níveis de E-caderina são determinantes para o comportamento biológico das células de câncer epitelial, e que o contato célula-célula construído por E-caderina impede a invasividade e a metástase.

A troca de E-caderina por N-caderina durante EMT (veja a Figura 14.15B) é também vista durante a gastrulação na embriogênese inicial. Além disso, o fator de crescimento de hepatócito (HGF) promove a troca de E para N-caderina em cultura de células epiblasticas (as quais derivam da camada celular ectodermal embrionária); desse modo, HGF induz EMT e permite a emigração de células precursoras do músculo e da derme a partir do dermomiótomo primitivo – a coleção de células do tipo epiteliais localizadas nos somitos de embriões jovens de vertebrados. No contexto da patogenia do câncer, HGF potencialmente induz mobilidade e invasividade em células de carcinoma.

Como E-caderina, N-caderina que é produzida em seu lugar participa das interações homofílicas, ou seja, liga-se a outras moléculas do mesmo tipo exibidas por células vizinhas. Conseqüentemente, moléculas de N-caderina expressas na superfície de células de carcinoma submetidas a EMT aumentam a afinidade dessas células de câncer por células do estroma abaixo da camada de células epiteliais. Essa associação parece ajudar na penetração das células do carcinoma no meio da população de células do estroma. Precisamente a mesma dinâmica tem sido proposta para explicar como os melanomas se desenvolvem: melanócitos normais expressam E-caderina, que conecta esses melanócitos aos queratinócitos ao redor; células de melanoma – derivadas de melanócitos transformados – expressam N-caderina, a qual facilita sua invasão no estroma da derme da pele e sua associação com fibroblastos e células epiteliais (Figura 14.16).

Também importante, a aquisição da expressão de N-caderina não resulta no acoplamento de grandes faixas de células de câncer que poderiam, em princípio, ser criadas pela formação de pontes de N-caderina entre células. Parece que pontes intermoleculares formadas entre pares de moléculas de N-caderina são mais frágeis do que aquelas formadas por homodímeros de E-caderina. Isso ajuda a explicar por que moléculas de N-caderina na superfície celular favorecem ativamente a mobilidade celular, com comportamento muito diverso de E-caderina, que funciona imobilizando células dentro de camadas epiteliais. Esse ponto é confirmado por experimentos nos quais vetores de expressão são usados para obtenção de altos níveis de expressão de N-caderina em culturas de células

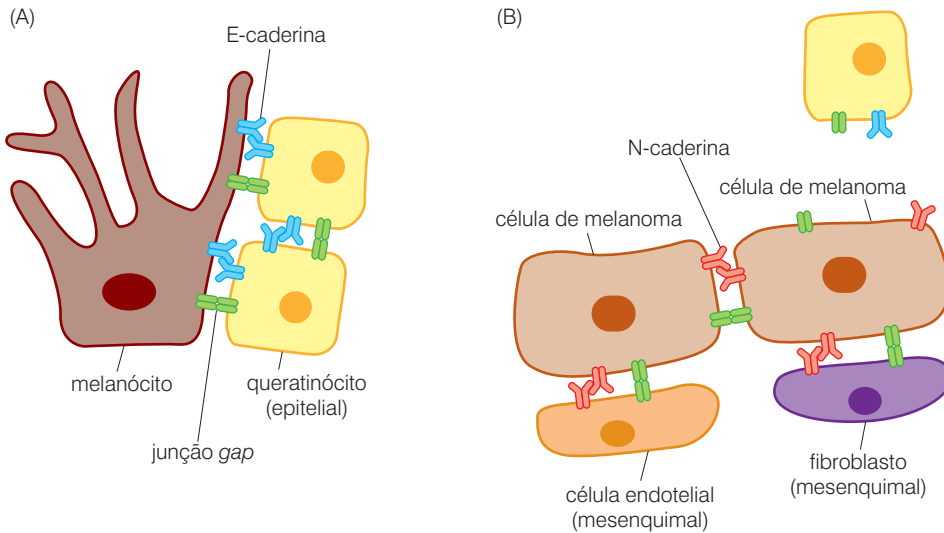


Figura 14.16 Troca de caderinas e invasividade de células do melanoma. Melanomas estão entre os tumores mais malignos devido às suas tendências em formar metástase amplamente uma vez alcançado um certo estágio de progressão tumoral. Esse comportamento é atribuído em parte à reativação do programa biológico-celular que permite um comportamento migratório de seus ancestrais da crista neural. A mudança de expressão de E para N-caderina, que ocorre quando melanócitos (A) se tornam transformados em células de melanoma (B), tem sido proposta por facilitar a invasão do estroma, pois a não-expressão de E-caderina (*azul*) faz com que essas células de câncer se soltem dos seus queratinócitos vizinhos da epiderme, enquanto a reposição pela expressão de N-caderina (*vermelho*) permite que tais células tumorais formem interações homotípicas com vários tipos de células mesenquimais, como fibroblastos e células endoteliais, que residem no estroma da pele (i. e., derme). (De N.K. Haass, K.S.M. Smalley e M. Herlyn, *J. Mol. Histol.* 35: 309-318, 2004.)

epiteliais normais. Cada expressão ectópica induz a aquisição de mobilidade e invasividade, como indicado por sua habilidade em romper matriz extracelular reconstruída (ECM) introduzida na placa de cultura.

14.4 A transição epitelial-mesenquimal é freqüentemente induzida por sinais do estroma

Como descrito anteriormente, a transição epitelial-mesenquimal (EMT) parece ser uma mudança irreversível que células de carcinoma adquirem no avanço em direção ao estado de crescimento altamente maligno. Realmente, existem razões para se acreditar que, durante o desenvolvimento de vários carcinomas, o fenótipo EMT é adquirido *reversivelmente*, e que, uma vez que essas células tenham completado os múltiplos passos de invasão e metástase, elas freqüentemente reverterem esse fenótipo para um fenótipo mais epitelial, passando pela transição epitelial-mesenquimal, mencionada no capítulo anterior.

Essa reversão sugere que EMT com freqüência é disparada por sinais que células de câncer possuem em um ambiente, mas não em outro. Então, células de carcinoma da linha de frente invasiva do tumor primário poderiam receber sinais específicos do estroma reativo próximo (Seção 13.3) que foram desenvolvidos durante a formação desse tumor. Entretanto, uma vez que células de câncer tenham deixado o tumor primário e se fixado em um sítio distante, elas poderiam receber sinais do ambiente do estroma que não induziriam EMT. Na ausência desse contexto de sinais, alguns dos quais são descritos a seguir, células de carcinoma poderiam passar pela transição mesenquimal-epitelial (MET) e reverter ao fenótipo de seus ancestrais no coração do tumor primário (Figura 14.17; Barra lateral 14.5).

De fato, técnicas histopatológicas tradicionais têm falhado em demonstrar EMT na margem invasiva de carcinomas primários por uma simples razão: uma vez que células tumorais passem por uma total EMT (i. e., perdem o trato epitelial e adquirem o mesenquimal) elas são essencialmente indistinguíveis das células mesenquimais do estroma ao redor. Por essa razão, demonstrações de EMT nas margens invasivas de tumores requerem o uso de anticorpos e reagentes celulares que não são normalmente usados em laboratórios de diagnóstico patológicos. O uso de anticorpos fluorescentes para detectar a localização intracelular de β -catenina (veja a Figura 14.14B) é um exemplo desse tipo de reagentes. Uma outra demonstração vem de células tumorais humanas xenotransplantadas, nas quais a expressão da integrina $\alpha_v\beta_6$ tem sido detectada por meio de imunocoloração (Figura 14.19A). Nessa instância, a expressão de $\alpha_v\beta_6$, um outro marcador de EMT, pode ser vista apenas em uma fina camada externa de células tumorais que estão em contato com o estroma associado ao tumor.

Um outro marcador de EMT é fornecido pela laminina 2 γ . Em geral, essa proteína é uma das três subunidades da laminina-5, um importante constituinte da membrana basal, à qual as células epiteliais ligam-se via integrinas específicas. Entretanto, células que passaram por EMT e se tornaram invasivas liberam apenas laminina 2 γ (e não as outras duas subunidades da laminina-5), e a clivagem da laminina 2 γ por metaloproteinases de matriz (Seção 14.6)

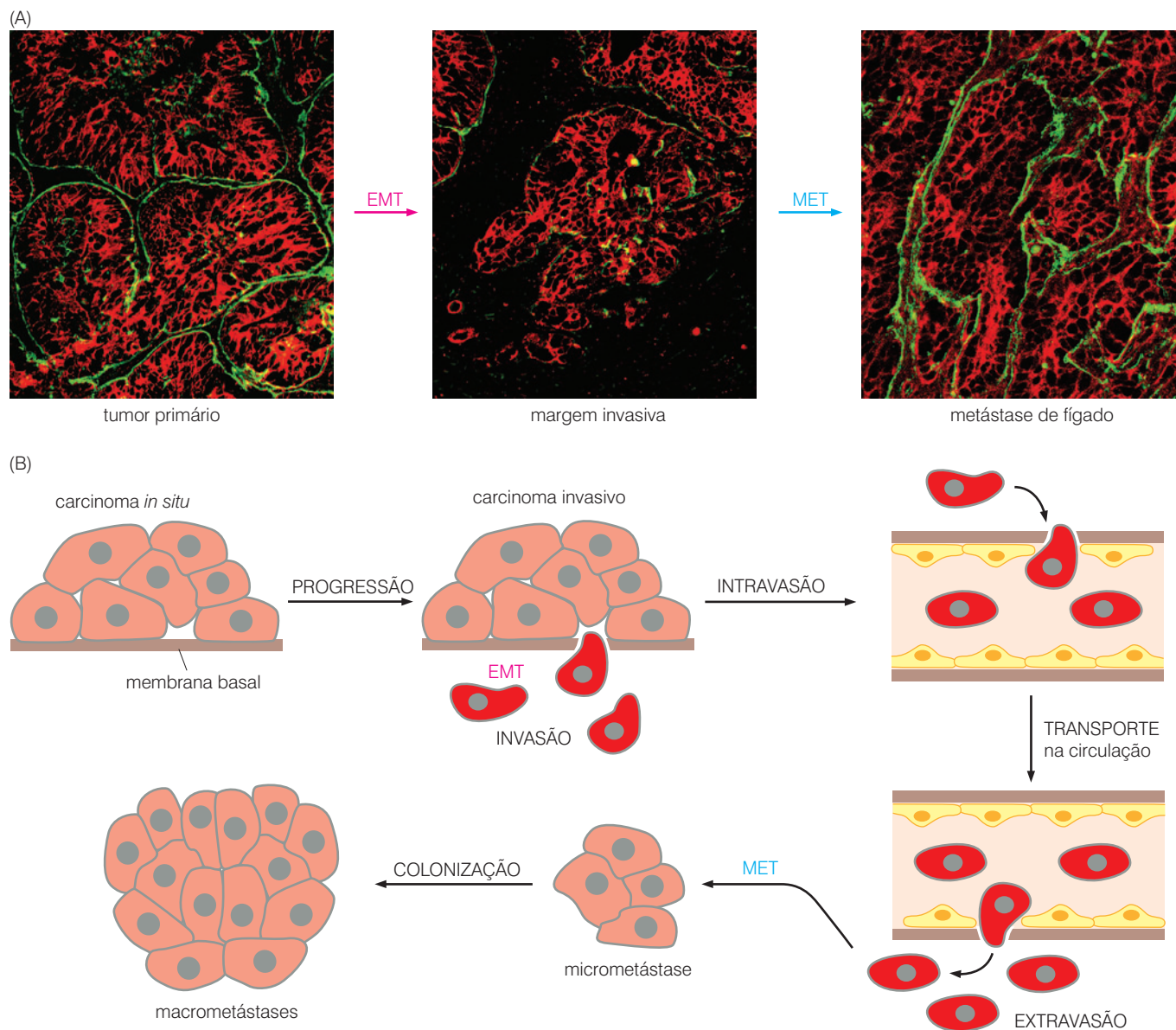


Figura 14.17 Reversibilidade de EMT Enquanto células da margem invasiva do carcinoma primário frequentemente dão evidências de EMT, metástases derivadas poderiam exibir uma histologia típica no centro do tumor primário. (A) A liberação de enzimas degradativas, notavelmente metaloproteinases de matriz (MMPs), é uma das muitas manifestações de EMT. Estas células em um carcinoma colorretal primário mostraram expressão de ambas, citoqueratina 18 (*vermelho*) e uma proteína da membrana basal (*verde*). Entretanto, na margem invasiva deste tumor, as células passaram por uma EMT parcial, na qual elas degradaram a membrana basal adjacente enquanto ainda expressavam citoqueratina 18, um marcador epitelial chave. Em uma metástase subsequente neste paciente, a qual presumivelmente descende de células que adquiriram invasividade *na rota* da disseminação da metástase, as células formaram um crescimento, tendo, uma vez ainda, a aparência histológica de células

do centro do tumor primário. (B) Observações como aquelas do painel A sugerem o esquema aqui descrito. Então, células de câncer epitelial na margem do carcinoma primário (*rosa*) sob EMT, invadem o estroma e se tornam mesenquimais (*células vermelhas*). Essa mudança poderia parecer disparada por sinais que essas células do carcinoma recebem do estroma associado ao tumor. O novo estado mesenquimal adquirido permite a tais células invadir localmente, intravasar e, subseqüentemente, extravasar o parênquima de um tecido distante. Uma vez que tenham se estabelecido nesse tecido, essas células encontram-se em um novo tipo de ambiente estromal, sem os sinais que previamente induziram seus ancestrais a passarem por EMT. Isso permite que elas revertam o fenótipo epitelial via transição epitelial-mesenquimal (MET). (A regeneração da membrana basal não está indicada aqui.) (A, cortesia de T. Brabletz; B, adaptada de J.P. Thiery, *Nat. Rev. Cancer* 2: 442-454, 2002.)

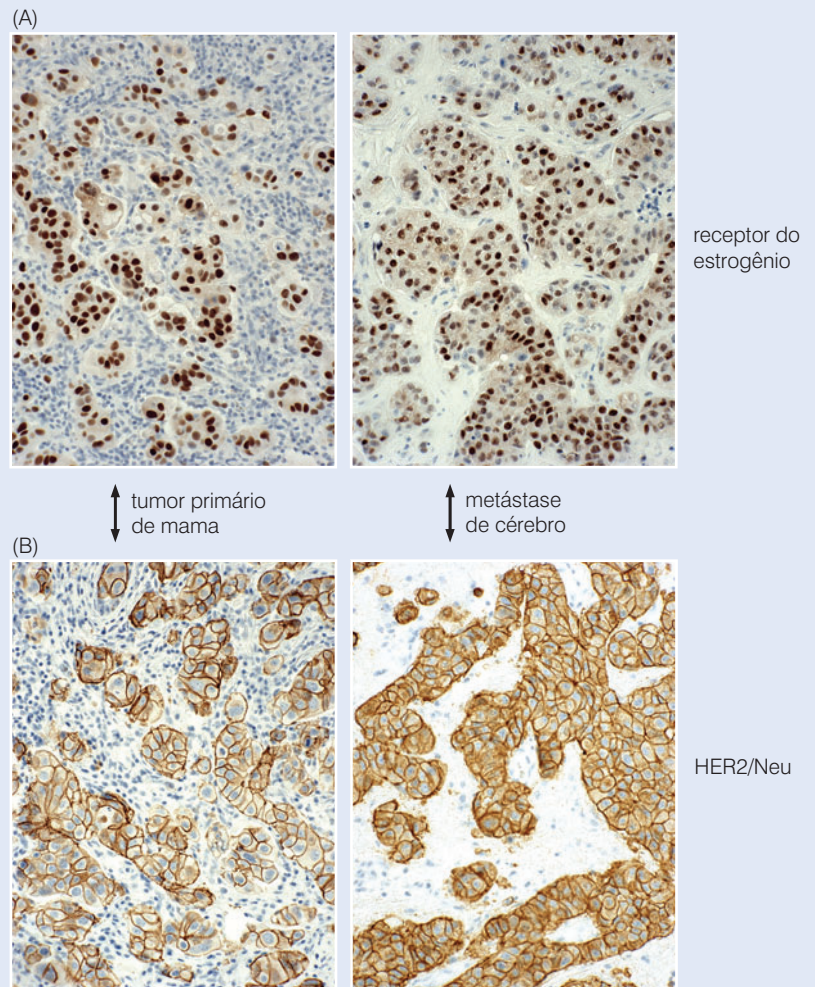
libera um fragmento que funciona como um ligante do receptor de EGF, facilitando a mobilidade e sobrevivência celular (Figura 14.19B).

Possivelmente, a mais vívida demonstração da conversão de fenótipo de células de carcinoma na margem invasiva do tumor vem do uso de um anticorpo antivimentina específico humano, o qual demonstra EMT na margem invasiva do tumor formado pelo crescimento de células epiteliais mamárias humanas transformadas experimentalmente como um xenoenxerto em um camundongo imunocomprometido (Figuras 14.19C e D). (O uso de anticorpos específicos humanos garante, nesse exemplo, que as células expressando vimentina derivam das células de carcinoma humano positivas para queratina, e não do estroma que as envolve, produzido pelo camundongo hospedeiro.)

Barra lateral 14.5 A reversibilidade de EMT explica uma peculiaridade de muitas metástases Todas as células de carcinoma que se tornam invasivas e metastáticas podem necessitar passar por EMT para adquirirem esses fenótipos complexos. (Cada célula pode passar por uma EMT total, durante a qual ela perde toda a característica epitelial, ou, alternativamente, pode passar apenas parcialmente por EMT, em que algumas características epiteliais são retidas junto com novas mesenquimais adquiridas.) Esse comportamento poderia parecer incompatível com um aspecto observado frequentemente em metástase humana: crescimentos secundários lembram, em nível histopatológico, o tumor

primário do qual foram originados (veja, por exemplo, as Figuras 14.17A e 14.18). De fato, as células em tais metástases parecem ser tão epiteliais no seu comportamento quanto a massa de células do tumor primário; ainda assim, elas descendem de células invasivas que supostamente passaram por EMT com o objetivo de iniciar a disseminação da metástase. Essa inconsistência é resolvida se assumirmos que EMT é totalmente reversível, e que linhagens de células de alta malignidade com frequência passam apenas transientemente através de um estado mesenquimal enquanto viajam do tumor primário para o local da formação da metástase.

Figura 14.18 A aparência do tumor primário e metástases derivadas Estas micrografias ilustram a impressionante similaridade na aparência e padrão de expressão de um tumor primário retirado de mama (*imagens da esquerda*) e uma metástase de cérebro detectada dois anos depois (*imagens da direita*). (A) Imuno-histoquímica usando um anticorpo anti-receptor de estrogênio (ER) revela a presença desta proteína (*marrom*) no núcleo de ambas, células do tumor primário e células de metástases. (B) Imuno-histoquímica usando um anticorpo anti-HER2/Neu revela a expressão desse receptor na superfície de células tumorais em ambos, tumor primário (*bordas em marrom*) e metástase de cérebro derivada. Em ambos os casos, a aparência das células epiteliais e daquelas células do estroma recrutadas são marcadamente similares. De fato, essa semelhança frequentemente ajuda patologistas a identificarem a origem do tumor primário do qual a metástase derivou e fornece suporte para o modelo descrito na Figura 14.17B. (Cortesia de T.A. Ince.)



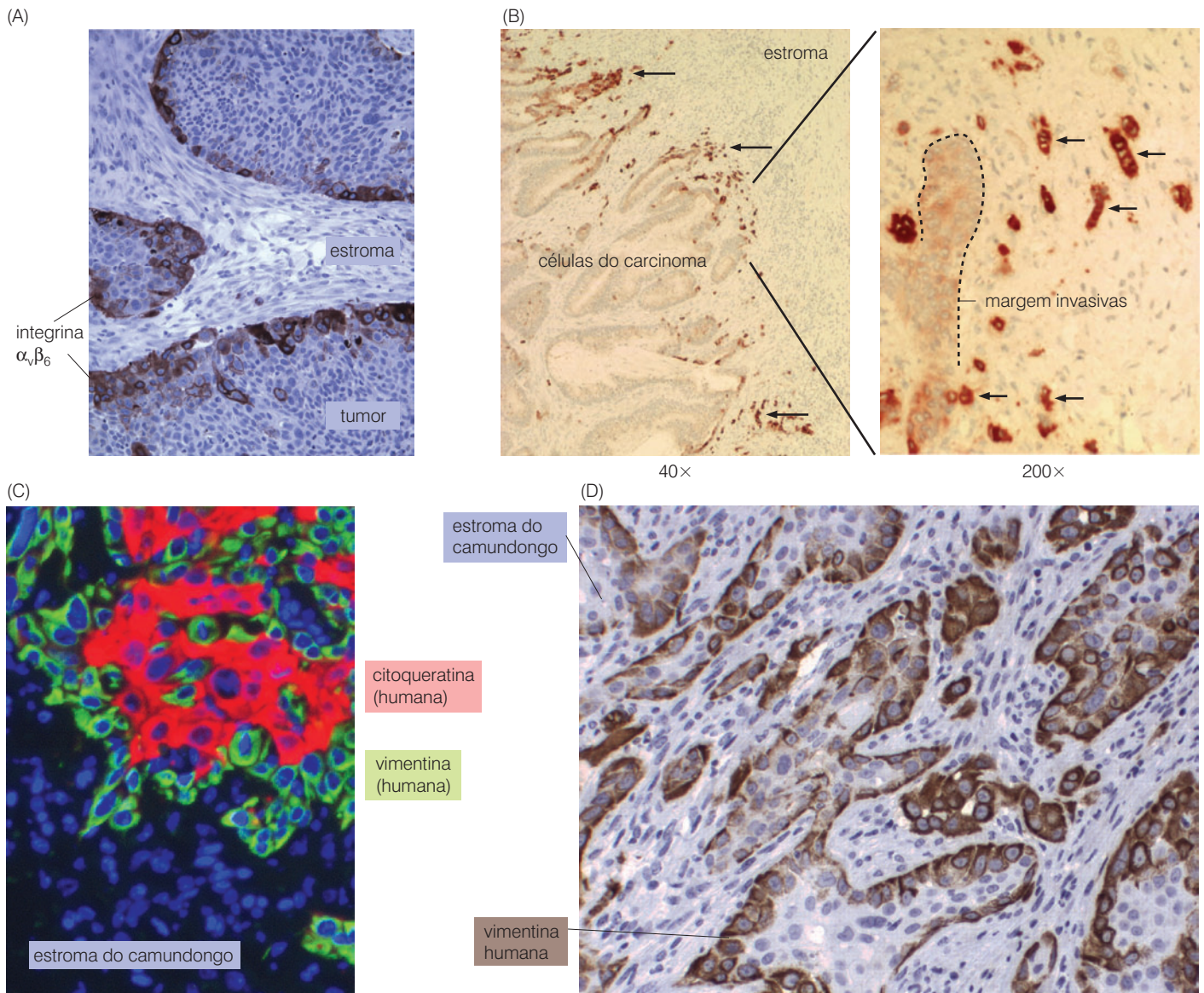


Figura 14.19 Manifestações de EMT na interface entre epitélio tumoral e estroma (A) A expressão da integrina $\alpha_v\beta_6$ está associada a EMT. Essa integrina é expressada em tecidos epiteliais em cicatrização de ferimentos ou inflamação crônica; isso também é visto em margem invasiva de carcinomas. Em um tumor xenoenxertado formado por células de carcinoma de faringe humana Detroit 562, a expressão de integrina $\alpha_v\beta_6$ é exibida por células de carcinoma na margem invasiva do tumor (*marrom-escuro*) que estão em contato direto com o estroma associado ao tumor, sugerindo que sinais do estroma são responsáveis por essa expressão em células epiteliais. (B) Laminina 2 γ normalmente serve como uma subunidade da molécula heterotrimérica laminina-5 da membrana basal (veja a Figura 13.5). Entretanto, células de carcinoma que passaram por EMT na margem invasiva secretam essa proteína, que imediatamente após é clivada no espaço extracelular por uma metaloproteinase de matriz (MT1-MMP) em um ligante de receptor de EGF que estimula as células de câncer a sobrevivência e mobilidade. Nesta micrografia, células da margem invasiva de carcinoma colorretal humano (*linha pontilhada, esquerda*) começaram a invadir o estroma (*direita*). Como indicado por imuno-histoquímica, células individuais de carcinoma que já tenham invadido profundamente o estroma expressam altos níveis de laminina 2 γ (*marrom, setas*). (C) Células epiteliais mamárias humanas transformadas experimentalmente (MECs) foram implantadas em um camundongo hospedeiro imunocomprometido. Células de carcinoma humano citoqueratina-positivas (*vermelho*)

dirigem-se para o centro da massa tumoral, e não estão em contato direto com células do estroma do camundongo que as envolvem, cuja presença é indicada apenas por seu núcleo corado com DAPI (*azul*). Entretanto, muitas das MECs humanas que estão em contato direto com o estroma passaram por EMT, como indicado pela perda da coloração de citoqueratina e por sua expressão em vez de vimentina específica humana (*verde*). (O uso de anticorpos que especificamente reconhecem vimentina humana [e não de camundongo] assegura que as células verdes na margem invasiva derivam das células humanas enxertadas, e não do camundongo hospedeiro.) Além disso, algumas dessas células de câncer na margem invasiva perderam a forma cuboidal das células de câncer epitelial e assumiram, por sua vez, uma forma fibroblástica mais alongada. (D) A exibição preferencial de vimentina na margem dessas ilhas de células de carcinoma é revelada aqui. Um tumor formado pela mesma linhagem de MECs humanas transformadas, descrito no painel C, pode ser visto aqui em um baixo aumento. Esta imagem deixa aparente que células do carcinoma que estão em contato direto com o estroma que as envolve passaram por EMT, como julgado pelo critério de exibição de vimentina (*marrom*), enquanto células tumorais no interior dessas ilhas não exibem vimentina humana e permaneceram, presumivelmente, em estado epitelial. (A, cortesia de D.R. Leone, B.M. Dolinski, e S.M. Violette, BiogenIdec; B, de E. Shinto, H. Tsuda, H. Ueno et al., *Lab. Invest.* 85: 257-266, 2005; C, cortesia de K. Hartwell e T.A. Ince; D, cortesia de T.A. Ince.)

Essas e outras observações indicam que o envolvimento de certos sinais heterotípicos originados no estroma reativo de carcinomas primários, vão de encontro a células neoplásticas localizadas nas margens externas da massa de células epiteliais, e induzem estas células a sofrer EMT. Evidências abundantes indicam que TGF- β é um importante agente que transporta esses sinais estromais. Outras observações implicam uma variedade de outros fatores, incluindo TNF- α (fator- α de necrose tumoral), fator de crescimento epidermal (EGF), HGF (fator de crescimento de hepatócito), e IGF-1 (fator-1 de crescimento semelhante à insulina). Parece provável que esses sinais estromais ajam em várias combinações um com o outro e com alelos mutantes, como os oncogenes *ras*, que residem em células epiteliais transformadas como o objetivo de ativar o seu programa EMT. (Presumivelmente a diversidade de fatores que induzem EMT reflete o grande número de passos em embriogênese normal durante os quais EMT ocorre, sendo induzida em vários locais durante o desenvolvimento do embrião por diversos sinais heterotípicos.)

Em um conjunto de experimentos, a exposição a TGF- β , de células epiteliais mamárias (MECs) de camundongos *ras*-transformados EpRas, resultou na perda progressiva da morfologia epitelial e na redução de marcadores epiteliais, incluindo citoqueratinas e E-caderina. Ao mesmo tempo, essas células transformadas adquiriram marcadores protéicos mesenquimais, como vimentina, e assumiram a morfologia, semelhante à dos fibroblastos – todos os marcadores de parede de EMT. De maneira provocativa, uma vez que essas células *ras*-transformadas passaram por EMT, elas começaram a produzir seu próprio TGF- β 1; este, agindo via uma alça de sinalização autócrina, permitiu a manutenção do seu fenótipo mesenquimal por longos períodos, mesmo quando o estímulo TGF- β foi retirado do seu meio de cultura (Figura 14.20A-D). Esses estudos sugerem que a sinalização via TGF- β pode atuar com o oncogene *ras* para causar câncer epitelial sob EMT. Similarmente, a manutenção da sinalização de TGF- β por uma alça de retroalimentação positiva poderia ter um importante papel na manutenção da expressão da integrina $\alpha_5\beta_6$ e EMT em células de carcinoma humano. Essa figura também indica que TGF- β pode, freqüentemente, ser produzido em abundância pelo estroma associado ao tumor (Figura 14.20E).

Dois dos efetores que atuam *downstream* na função de Ras (veja as Seções 6.5 e 6.6) parecem ser responsáveis pela colaboração entre Ras e TGF- β . A oncoproteína Raf, que funciona imediatamente *downstream* a Ras, pode produzir um EMT por si só: isso induz células EpRas transformadas a secretarem TGF- β , que então age de um modo autócrino para induzir EMT nessas células. PI3K, um outro efector da oncoproteína Ras, protege células Ras transformadas de efeitos citostáticos e pró-apoptóticos de TGF- β .

Um mecanismo relacionado também parece explicar a progressão de tumores de pele que tenham sido iniciados, em camundongos, pela ativação do oncogene *ras*. As células desses tumores evoluem para um fenótipo altamente diferenciado, de célula escamosa (veja a Figura 2.6A,B) em células de câncer que são móveis, em formato de fuso e metastáticas. (Células em formato de fuso exibem uma morfologia similar àquelas de fibroblastos transformados.) Essa progressão para um estado altamente maligno é acompanhada e causada provavelmente por um aumento progressivo nos níveis da oncoproteína Ras, assim como pelo aumento da localização nuclear do fator de transcrição Smad2, este último indicando intensa sinalização por meio da via TGF- β (veja a Figura 6.29D).

O papel de TGF- β em promover ativamente a agressividade de células de câncer malignas contrasta gravemente com nossas primeiras discussões dos seus efeitos antiproliferativos. Fortes evidências de que TGF- β pode favorecer o comportamento celular maligno são fornecidas por numerosos estudos, nos quais os níveis de TGF- β associado a tumor (freqüentemente TGF- β 1) foram encontrados por elevar-se paralelamente ao aumento do grau de invasividade e agressividade do tumor. De fato, altos níveis de TGF- β , em ambas, massa tumoral e circulação geral, conferem um prognóstico ruim para o paciente com câncer.

Resumindo essa e outras observações, TGF- β pode contribuir para a invasividade da célula de câncer por ao menos quatro razões. Primeira, muitos carcinomas humanos surgindo do lado de fora do intestino retêm ao menos alguma sinalização funcional de receptor de TGF- β ,

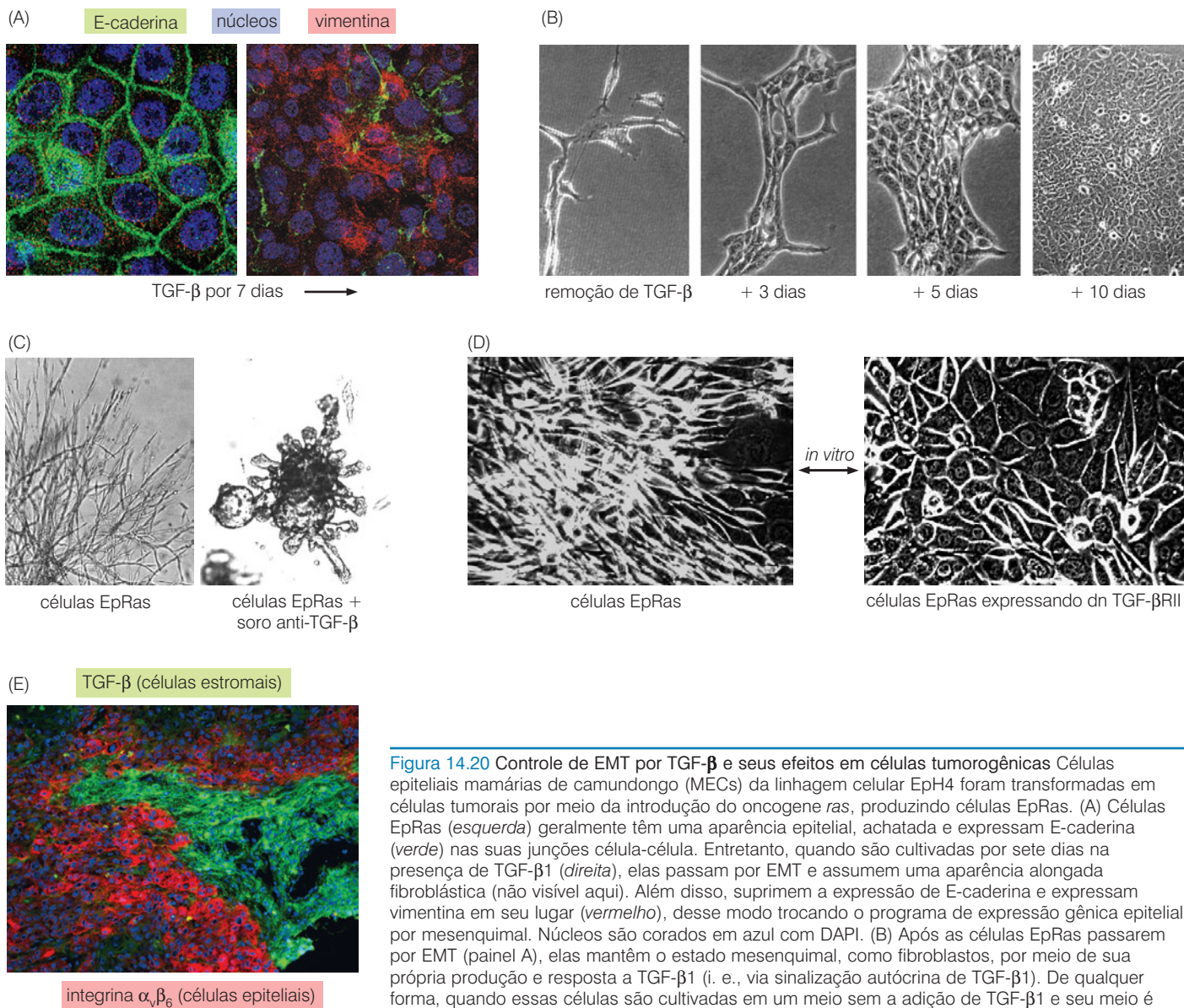


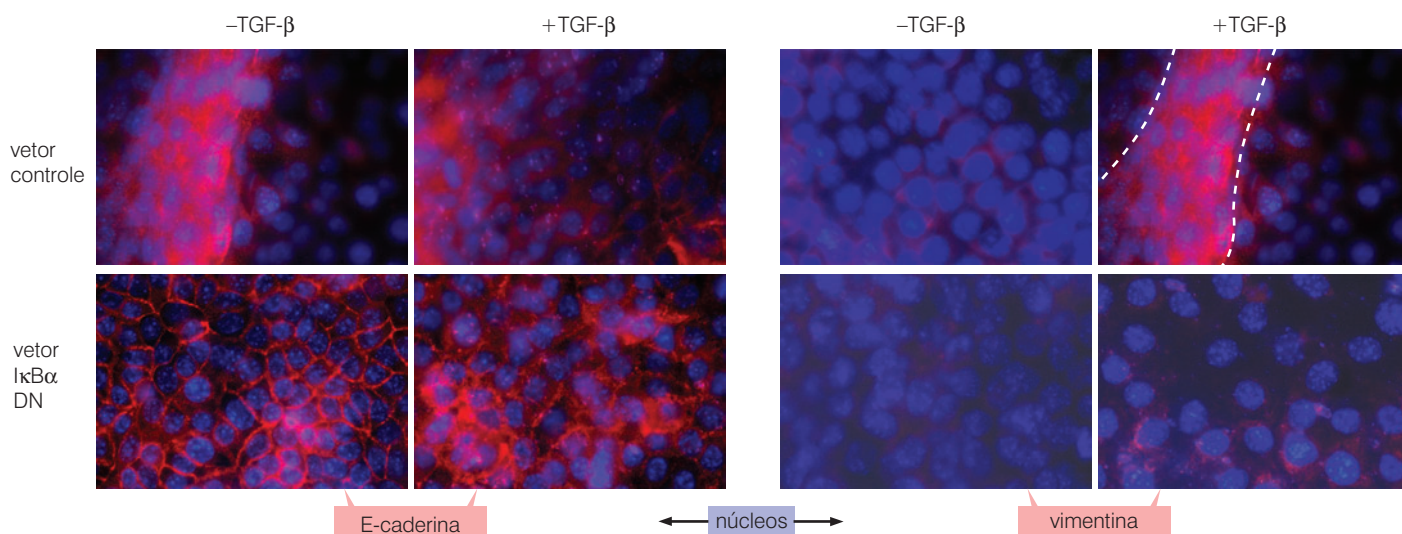
Figura 14.20 Controle de EMT por TGF- β e seus efeitos em células tumorogênicas. Células epiteliais mamárias de camundongo (MECs) da linhagem celular EpH4 foram transformadas em células tumorais por meio da introdução do oncogene *ras*, produzindo células EpRas. (A) Células EpRas (esquerda) geralmente têm uma aparência epitelial, achatada e expressam E-caderina (verde) nas suas junções célula-célula. Entretanto, quando são cultivadas por sete dias na presença de TGF- β 1 (direita), elas passam por EMT e assumem uma aparência alongada fibroblástica (não visível aqui). Além disso, suprimem a expressão de E-caderina e expressam vimentina em seu lugar (vermelho), desse modo trocando o programa de expressão gênica epitelial por mesenquimal. Núcleos são corados em azul com DAPI. (B) Após as células EpRas passarem por EMT (painel A), elas mantêm o estado mesenquimal, como fibroblastos, por meio de sua própria produção e resposta a TGF- β 1 (i. e., via sinalização autócrina de TGF- β 1). De qualquer forma, quando essas células são cultivadas em um meio sem a adição de TGF- β 1 e seu meio é trocado diariamente (para remover qualquer TGF- β que possa ter sido secretado), sua aparência gradualmente reverte para um fenótipo epitelial achatado, como mostrado após 3, 5 e 10 dias de cultura (esquerda para direita), indicando que elas passaram por uma transição epitelial-mesenquimal (MET). (C) Quando células EpRas que tenham crescido em um tumor na presença de altas concentrações de TGF- β autócrino são colocadas em géis de colágeno *in vitro*, elas formam estruturas altamente invasivas, vistas aqui (painel da esquerda). Entretanto, se essas células são propagadas *in vitro* em condições idênticas na presença de anti-soro que neutraliza TGF- β 1 (por sequestrar qualquer TGF- β produzido por elas), elas reverterem para o fenótipo epitelial, formando estruturas em ducto em géis de colágeno, que são típicas daquelas formadas por MECs cultivadas normalmente (painel da direita). (D) O uso de um receptor de TGF- β do tipo II, negativo-dominante (dn) (que efetivamente bloqueia sinalização via TGF- β autócrino), fornece mais uma evidência de que a sinalização via TGF- β autócrina por células EpRas é requerida para a manutenção do seu estado mesenquimal. Quando essa sinalização é bloqueada pela expressão do seu receptor, a aparência mesenquimal das células EpRas (esquerda) desaparece, e elas assumem uma aparência epitelial (direita), indicando, como antes, que elas passaram por uma transição mesenquimal-epitelial (MET). (E) Células de carcinoma Detroit 562 cresceram em um tumor expressando a integrina $\alpha_v\beta_6$ (vermelho, veja a Figura 14.19A), o que é um indício da sua passagem por EMT, enquanto TGF- β (verde) está sendo produzido por células do estroma associado ao tumor. $\alpha_v\beta_6$ exibida pelas células do tumor pode ativar a forma latente de TGF- β produzido por células estromais, dessa forma criando um fator que é um forte indutor de EMT e a expressão adicional da integrina $\alpha_v\beta_6$ por células epiteliais, resultando uma alça de retroalimentação positiva com sustento próprio. (A, de E. Janda, K. Lehmann, I. Killisch et al., *J. Cell Biol.* 156: 299-314, 2002; B e C, de M. Oft, J. Peli, B.M. Dolinski e S.M. Violette, BiogenIddec.)

o que lhes permite continuar respondendo a TGF- β durante todo o curso da progressão tumoral. (Isso contrasta com a situação observada em um subconjunto de carcinomas de cólon, nos quais a função do receptor poderia ser inteiramente perdida por meio de mutações nos genes que codificam o receptor; veja a Seção 12.9). Segunda, a inativação da via do pRb, que ocorre em muitos, senão em todos os cânceres humanos, originando células malignas que perdem a reação aos efeitos citostáticos de TGF- β (veja a Seção 8.10); essa perda permite que as células respondam a outros tipos de sinais *downstream* que são liberados pela ativação dada pelos receptores de TGF- β ativados pela ligação. Terceira, na ausência de efeitos citostáticos de TGF- β , a exposição das células de câncer a esse fator poderia realmente *favorecer* sua proliferação. Por exemplo, células de glioblastoma e osteossarcoma que são tratadas com TGF- β respondem produzindo e secretando PDGF; uma vez liberado, PDGF age de um modo autócrino, estimulando a proliferação dessas células de câncer via receptores de PDGF que elas exibem. Finalmente, a exposição de células de câncer de mama ao TGF- β causa a liberação de outros fatores que aceleram a quebra da coluna mineralizada – um passo crítico na formação de metástase *osteolítica*; como iremos ver mais adiante, essa quebra libera mitógenos adicionais que dirigem a proliferação celular do câncer.

TGF- α , agindo sozinho ou em conjunto com TGF- β , também parece ser um importante agente para indução de EMT. No início da progressão tumoral, TGF- α com frequência é produzido por células inflamatórias, como macrófagos (veja a Seção 11.16). Nesse estágio, ele funciona por meio de seus receptores para ativar a via de sinalização NF- κ B em células epiteliais. TGF- β também ativa a via NF- κ B em células epiteliais, como as células epiteliais mamárias de camundongo imortalizadas, discutidas anteriormente. Em vários tumores, TGF- α e TGF- β podem contribuir, em diferentes proporções, para a manutenção da sinalização de NF- κ B ativa. Essa sinalização parece ser crítica para a indução e manutenção de EMT, como indicado pelo trabalho com células epiteliais de camundongo EpRas. Então, o bloqueio da sinalização NF- κ B previne a expressão de seu programa EMT (Figura 14.21).

A influência dos macrófagos do estroma no comportamento invasivo e metastático das células de câncer primário pode ser demonstrada pelo estudo de camundongos alterados geneticamente, com a falta da habilidade em produzir o fator 1 estimulador de colônias (CSF-1). Como foi discutido no capítulo anterior, o aparecimento de carcinomas mamários em camundongos transgênicos com tendência a câncer geralmente recrutam grandes números de macrófagos associados a tumor (TAM). Entretanto, quando células tumorais nesses camundongos perdem a habilidade de produzir CSF-1, TAMs são virtualmente ausentes (veja a Figura 13.24). A ausência de CSF-1 e TAMs não tem efeito no crescimento do tumor primário (Figura 14.22A), mas esses tumores mostraram um comportamento benigno e não-invasivo, em contraste com tumores que tiveram sucesso em

Figura 14.21 A via de sinalização de NF- κ B e a indução de EMT. Células da linhagem EpRas, originadas de células epiteliais de mama de camundongo transformadas (veja a Figura 14.20), foram tratadas com TGF- β (2ª e 4ª micrografias, linha superior). Isso ocasionou a supressão da expressão da E-caderina (rosa, 1ª e 2ª micrografias, linha superior), assim como uma indução de vimentina (rosa, 3ª e 4ª micrografias, linha superior). Entretanto, quando a forma negativa-dominante de I κ B α , que bloqueia a sinalização de NF- κ B (veja a Figura 6.29A), foi expressada nessas células (linha inferior), o tratamento com TGF- β falhou em suprimir a expressão de E-caderina (rosa, 1ª e 2ª micrografias) e em induzir a expressão de vimentina (rosa, 3ª e 4ª micrografias). Isso indicou que a sinalização de NF- κ B foi necessária para a indução de EMT nessas células. Outros experimentos (*não-mostrados*) indicaram que a ativação constitutiva de NF- κ B foi suficiente para induzir EMT nessas células. (De M.A. Huber, N. Azoitei, B. Baumann et al., *J. Clin. Invest.* 114: 569-581, 2004.)



recrutar TAMs (Figura 14.22B). A influência desses macrófagos no comportamento metastático é impressionante: sem TAMs, esses tumores de mama falham em desenvolver metástase para os pulmões (Figura 14.22C).

Este experimento fornece evidências convincentes de que o comportamento invasivo e metastático das células de carcinoma de mama de tais camundongos é muito influenciado por sinais que essas células de carcinoma recebem das células do estroma, nesse caso, macrófagos. Ele falha, entretanto, em revelar a natureza precisa desses sinais. É provável que TGF- α derivado de macrófagos, como discutido anteriormente, contribua para a indução de EMT em células de câncer e, em consequência, para o comportamento invasivo e metastático descrito na Figura 14.22. Um outro sinal-chave, derivado de macrófagos, é provavelmente transportado por EGF.

Algumas das evidências favorecendo EGF como indutor-chave da invasividade das células de câncer vêm de estudos de células de câncer de mama de camundongo *in vitro* e *in vivo*. Como muitas células epiteliais, células de carcinoma expressam receptores de EGF, e a ativação desses receptores por EGF faz com que adquiram mobilidade, invasividade e secretem CSF-1, que atrai e estimula macrófagos (Figura 14.23). Macrófagos respondem a CSF-1 por proliferação e liberação de EGF, que, por sua vez, ativa células de câncer. Esses efeitos todos procedem mais por meio de sinalização parácrina que autócrina, pois

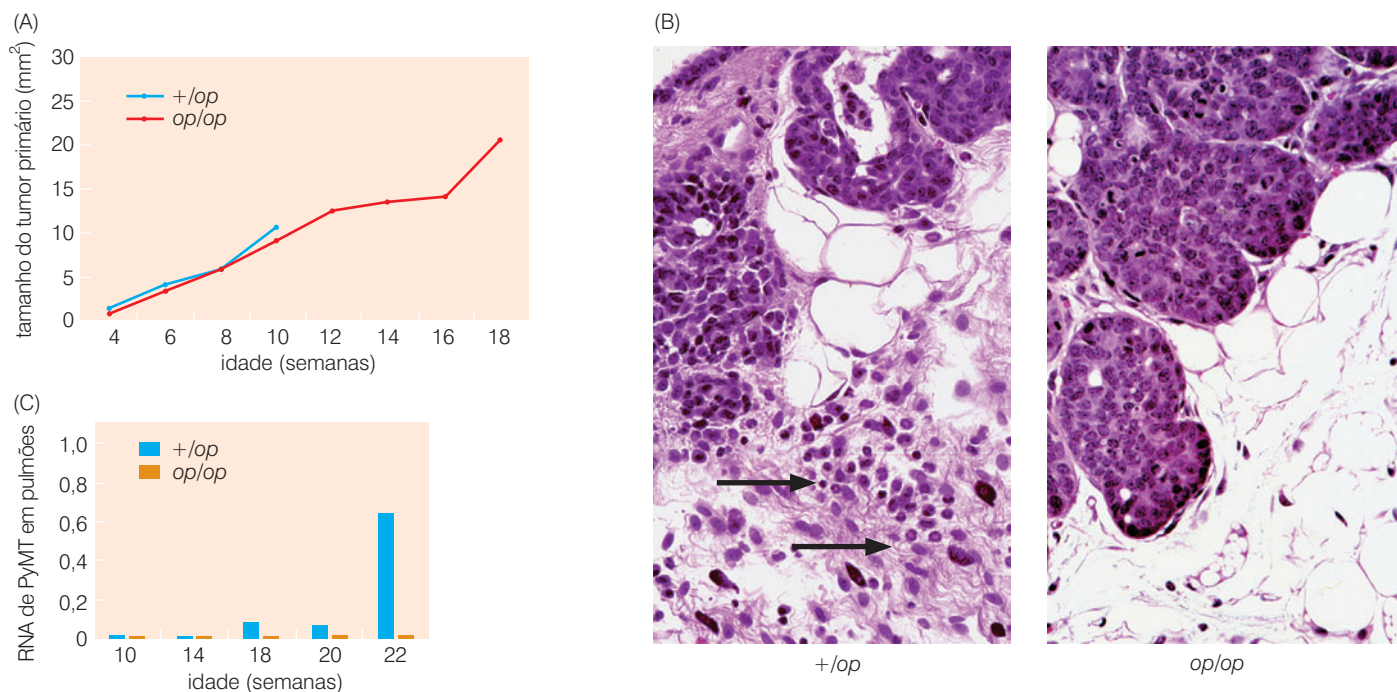


Figura 14.22 Efeitos dos macrófagos na invasão e metástase

Camundongos de uma linhagem transgênica desenvolvem carcinomas mamários pela expressão do transgene no qual o promotor MMTV dirige a expressão do oncogene middle T de polioma (PyTM). Esse transgene tem sido introduzido, por meio de cruzamento, em camundongos que podem (Csf ^{+/op}) ou não (Csf ^{op/op}) produzir o fator-1 estimulador de colônias (CSF-1), que é necessário para recrutar macrófagos para a massa tumoral (veja a Figura 13.24). (A) A presença (em camundongos Csf ^{+/op}) ou ausência (em camundongos Csf ^{op/op}) de macrófagos associados a tumor recrutados (TAMs) não tem efeito na habilidade no crescimento de tumores de mama primários nesses camundongos transgênicos. (B) Tais tumores que surgem em camundongos Csf ^{+/op} (cujos tumores contêm muitos TAMs, *não-mostrado*) desenvolveram um fenótipo altamente invasivo, no qual

células de carcinoma individuais invadem o estroma próximo em grandes números (*painel da esquerda, setas*). Entretanto, se tumores se desenvolvem em camundongos Csf ^{op/op}, nos quais macrófagos não podem ser recrutados para o estroma associado ao tumor (*painel da direita*), as células do tumor não quebram a membrana basal, e o tumor como um todo permanece encapsulado e benigno, indicando que os macrófagos contribuem de maneiras essenciais para a invasividade do tumor. (C) Em camundongos Csf ^{+/op}, metástases nos pulmões começam a aparecer em 18 semanas e aumentam progressivamente desde então (*barras azuis*), como estimado pela quantidade de RNA de poliomavírus T médio (expressado em células tumorais) presente nos pulmões (*ordenada*). Entretanto, em camundongos Csf ^{op/op} TAM-negativos (*barras laranja*), metástases são virtualmente ausentes. (De E.Y. Lin, A.V. Nguyen, R.G. Russell e J.W. Pollard, *J. Exp. Med.* 193: 727-740, 2001.)

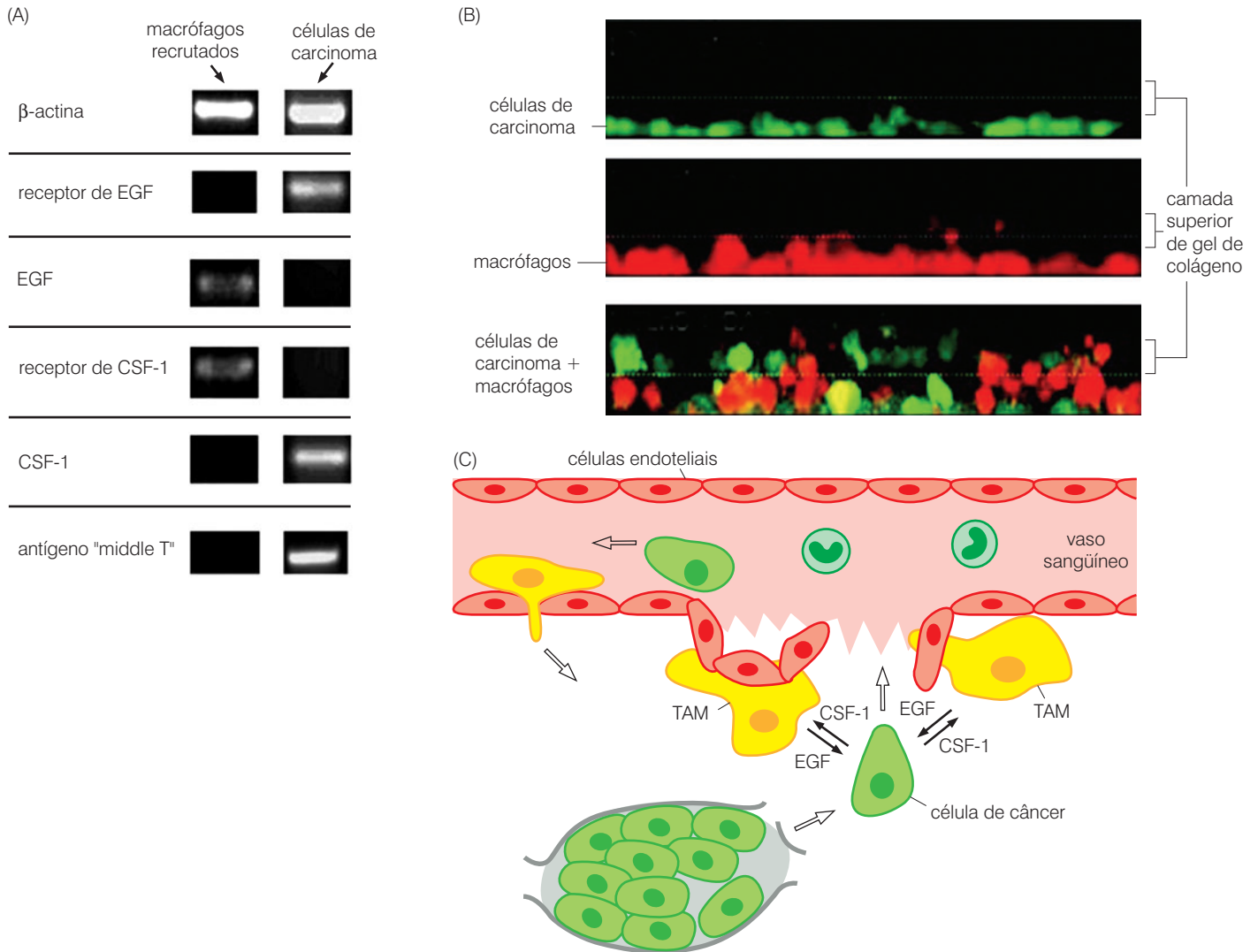
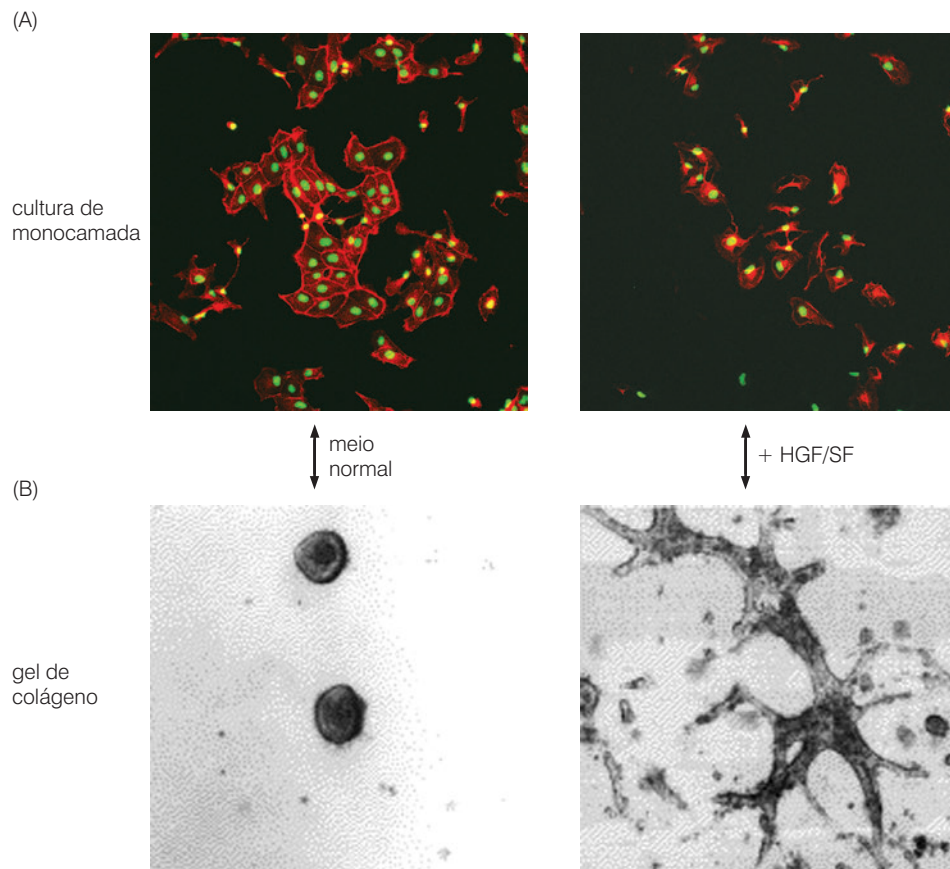


Figura 14.23 Estimulação recíproca de células de câncer de mama e macrófagos Uma variedade de experimentos indica que macrófagos são a maior fonte de EGF em cânceres de mama. EGF é conhecido por ser hábil em estimular células epiteliais de câncer a proliferarem e invadirem a matriz extracelular. Além disso, a exposição a EGF induz as células de câncer de mama a liberarem CSF-1, o que lhes permite recrutar macrófagos e estimulá-los a produzirem mais EGF, resultando em uma alça de retroalimentação positiva entre esses dois tipos celulares. (A) Análises por PCR mostraram que os níveis de mRNA desses dois fatores de crescimento e seus receptores são reciprocamente expressados em células de carcinoma mamário que surgem em camundongos transgênicos com tendência a câncer (veja a Figura 14.22) e em macrófagos estromais recrutados. (B) Células de câncer de mama (marcadas aqui com a proteína verde fluorescente, GFP) foram colocadas no fundo de uma placa de Petri (*vista lateral*) abaixo de uma camada de gel de colágeno (*imagem de cima*), onde

permaneceram. Similarmente, macrófagos (*vermelho*) também permaneceram onde foram inicialmente colocados, no fundo da placa de Petri abaixo do gel de colágeno (*imagem do meio*). Entretanto, quando as duas populações foram co-cultivadas nessa posição, células de câncer de mama (*verde*) foram então induzidas a se moverem para cima e invadir a camada superior de gel de colágeno (*imagem inferior*). (C) Interações recíprocas entre células de câncer de mama e macrófagos são ilustradas esquematicamente. Como macrófagos são frequentemente encontrados próximos a microvasos, a estimulação da mobilidade e invasividade de células de câncer de mama por macrófagos associados a tumor (TAMs) pode também contribuir para a intravação de células de câncer, como descrito aqui. (A, de J. Wyckoff, W. Wang, E.Y. Lin et al., *Cancer Res.* 64:7022- 7029, 2004; B, de S. Goswami, E. Sahai, J.B. Wyckoff et al., *Cancer Res.* 65: 5278- 5283, 2005; C, de W.Wang, S. Goswami, E. Sahai et al., *Trends Cell Biol.* 15:138-145, 2005.)

células de câncer de mama não expressam receptores de CSF-1 e macrófagos não expressam receptores de EGF (veja a Figura 14.23A). Conseqüentemente, esses dois tipos de células colaboram por estimulação recíproca uma à outra, produzindo um outro tipo de alça de retroalimentação positiva. Enquanto a mobilidade e a invasividade de células de câncer são claramente demonstradas nesses experimentos, a indução de EMT nessas células pode apenas ser inferida pela aquisição de mobilidade, comportamento invasivo.

Figura 14.24 Espalhamento celular e comportamento celular invasivo induzido por HGF. O fator de crescimento de hepatócito (HGF), também conhecido como fator disseminador (SF), é produzido por uma variedade de tipos de células estromais. Isso tem profundos efeitos em células epiteliais que exibem seu receptor cognato, Met. (A) Mostradas aqui estão células MDCK (rim canino Maden-Darby, *citoplasma vermelho*), que são bastante usadas para estudo de biologia celular epitelial. As células no painel da esquerda foram crescidas em meio normal, enquanto as células do painel da direita foram crescidas em meio com HGF/SF. Em cultura de monocamada, essas células epiteliais normalmente formam conjuntos de células. Entretanto, após o tratamento com HGF/SF, elas tornaram-se móveis e espalharam-se em muitas direções. (B) Quando introduzidas em géis de colágeno, células MDCK normalmente formam pequenas massas esféricas (*painel da esquerda*). Entretanto, seguindo exposição com HGF/SF, essas células crescem em processos longos invadindo o gel de colágeno ao redor (*painel da direita*). (A, cortesia de J.H. Resau; B, cortesia de U. Schaeper, de M. Rosario e W. Birchmeier, *Trends Cell Biol.* 13: 328- 335, 2003.)



HGF, outro ligante de origem estromal, é também capaz de induzir muitos dos atributos de EMT em células epiteliais, as quais exibem Met, seu receptor cognato, na sua superfície (Figura 14.24).

Essas diversas linhas de evidência sugerem que a aquisição de traços de malignidade por células de câncer, incluindo indução de EMT, não é apenas coordenada pelo genoma dessas células. Ao contrário, essas profundas mudanças no fenótipo celular são frequentemente iniciadas pela colaboração entre alelos mutantes específicos contidos no genoma de células de câncer (p. ex., o oncogene *ras*) e sinais que estas células recebem em alguns microambientes teciduais, especificamente nas ligações entre o epitélio do tumor e o estroma reativo. Em muitos tumores, esses sinais contextuais são conduzidos por certos fatores, como TGF- β e TNF- α , que são liberados por células do estroma reativo (Figura 14.25). Outros sinais estromais, como aqueles transmitidos por EGF e HGF, podem também ajudar a elucidar muitas das mudanças associadas a invasividade de câncer e EMT. Esse cenário descreve o comportamento de muitos carcinomas, mas não pode descrever com precisão o comportamento de todos eles.

Por todo este texto, nossos achados têm sido dirigidos pela noção de que fenótipos de células de câncer são ditados por seus genótipos e que o crescimento tumorogênico é essencialmente um fenômeno autônomo da célula. Interações heterotípicas (Capítulo 13) revisaram essa noção parcamente, indicando que células de câncer mostram um surpreendente grau de dependência de vizinhos normais para vários tipos de sustento e apoio. Finalizamos com a idéia de que o microambiente de células de câncer podem fundamentalmente transformar o fenótipo de células, especificamente induzindo mudanças profundas no comportamento celular, que compreendem EMT.

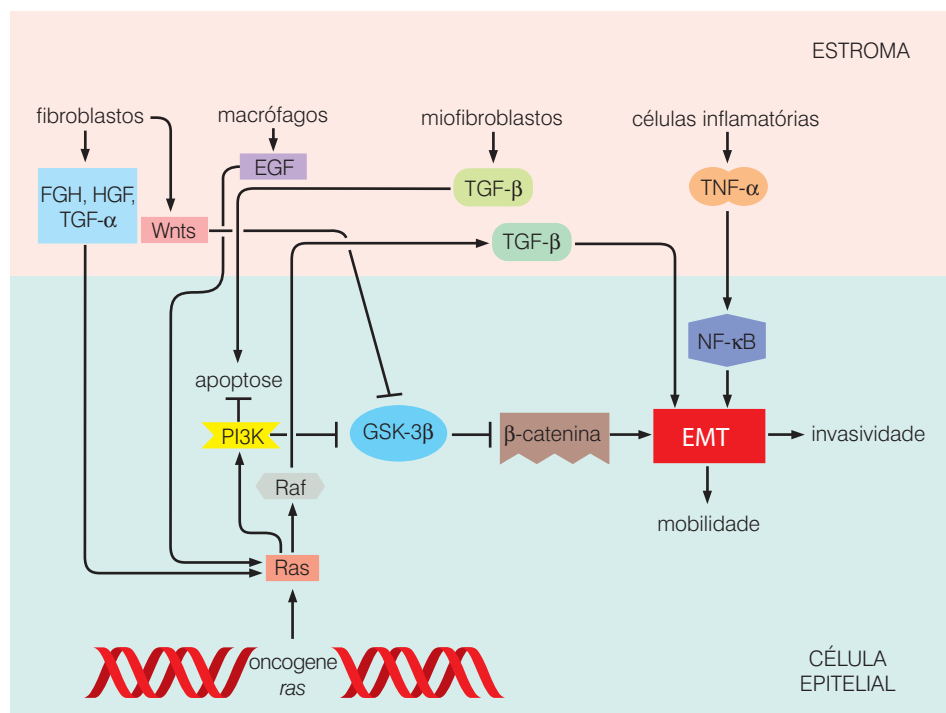


Figura 14.25 Sinais que disparam EMT Este diagrama representa uma visão bastante simplificada dos canais de sinalização originados no estroma e que influenciam células de câncer epitelial a passarem por uma EMT parcial ou completa. É provável que EMT seja normalmente disparada em resposta a uma mistura de sinais que células do carcinoma recebem do estroma junto com sinais intracelulares, como aqueles liberados pelo oncogene *ras*, como indicado aqui. As identidades precisas desses sinais estromais e seus mecanismos combinatórios de ação ainda não foram elucidados.

14.5 EMTs são programadas por fatores de transcrição que orquestram passos-chave na embriogênese

A execução do programa de EMT depende da mudança na expressão de dezenas, talvez centenas, de distintos genes. Tais mudanças afetam muitos aspectos da biologia celular, nem todos enumerados neste livro. Elas incluem organização nos filamentos intermediários do citoesqueleto, mobilidade, associação com células vizinhas, liberação de proteases, e mesmo a exibição de integrinas na superfície celular e receptores de fatores de crescimento (veja a Tabela 14.2). Enquanto extensivas evidências implicam em sinais estromais como elementos-chave no disparo de EMT em células de carcinoma, nenhuma dessas evidências revela como o complexo programa de EMT é realmente coordenado nas células epiteliais.

A genética do desenvolvimento primário tem providenciado muitas das respostas a essa questão. Alguns genes que especificam para a atuação pleiotrópica, fatores de transcrição que induzem EMT têm sido identificados, largamente em *Drosophila melanogaster*. Muitos desses genes e fatores de transcrição codificados são conservados em cordados e foram encontrados no controle de passos-chave da embriogênese primária em embriões de rãs e camundongos; esses passos envolvem vários tipos de EMT. (A forte conservação desses genes indica que EMT e passos-chave da embriogênese primária foram desenvolvidos inicialmente na evolução de metazoários, antes da ramificação dos vários filos de metazoários.) Por ativação desses fatores de transcrição, células de câncer ganham acesso ao programa complexo de múltiplos componentes de EMT que elas orquestram.

Mais da metade dos fatores de transcrição foram descritos, cada um dos quais sendo capaz de induzir EMT quando expressado ectopicamente em certas células epiteliais (Tabela 14.3). Por exemplo, Snail é um fator de transcrição primeiramente descrito em *Drosophila* (Figura 14.26). Desde sua descrição inicial, Snail foi identificado em uma grande quantidade de metazoários, incluindo vertebrados, insetos, vermes e moluscos. Em embriões de vertebrados primários, Snail é expressado primeiro na porção do ectoderma que é destinada a tornar-se mesoderma seguindo a gastrulação. Durante a embriogênese, Snail, Slug e Twist convertem células epiteliais em células mesenquimais migratórias que formam o mesoderma. Snail e

Tabela 14.3 Fatores de transcrição que orquestram EMT

Nome	Onde foi primeiro identificado	Tipo de fator de transcrição	Associação com câncer
E47/E2A	associado com promotor de E-caderina	bHLH	
FOXC2	formação do mesênquima	<i>winged</i> hélice/ <i>forkhead</i>	câncer de mama tipo basal
Goosecoid	gastrulação em sapo	homeodomínio pareado	vários carcinomas
SIP1	neurogênese	dedos de zinco <i>2-handed</i> /homeodomínio	carcinomas de fígado, mama, ovário
Slug	delaminação da crista neural e mesoderme primária em galinha	dedos de zinco tipo C2H2	linhagens celulares de câncer de mama, melanoma
Snail	indução da mesoderme em <i>Drosophila</i> ; migração da crista neural em vertebrados	dedos de zinco tipo C2H2	carcinoma do ducto invasivo
Twist	indução da mesoderme em <i>Drosophila</i> ; emigração da crista neural	bHLH	câncer de mama lobular invasivo, carcinoma gástrico tipo difuso, melanoma de alto-grau e neuroblastoma

Slug estão envolvidos, ainda, em outro passo embriogênico no qual um tipo de tecido é transformado em outro.

De fato, quando monocamadas epiteliais são injuriadas experimentalmente, a expressão de Slug é induzida nas células epiteliais sobreviventes na margem do ferimento, com o objetivo de permitir que essas células adquiram mobilidade e migrem para o local da injúria (Figura 14.27). A expressão de Slug ajuda a explicar como células epiteliais na margem de locais injuriados entram em EMT transiente para a reconstrução de camadas de células (veja a Figura 13.13C). Observações como essa ampliam nossas perspectivas com relação aos fatores de transcrição (TFs) e seus papéis biológicos normais: além de programarem passos-chave na embriogênese inicial, a expressão de alguns desses TFs poderia ser recrutada transientemente em adultos com o objetivo de reconstruir tecidos danificados.

Snail e Slug são membros dos fatores de transcrição do tipo dedo de zinco C2H2. Os fatores de transcrição Snail-Slug parecem operar bastante como repressores de transcrição. Então, ambos foram descobertos por serem hábeis em reprimir a transcrição do gene de E-caderina. Como foi visto anteriormente, a perda da expressão de E-caderina pode, por si só, originar células epiteliais que assumem muitas mudanças fenotípicas associadas a EMT.

A expressão de Snail foi encontrada em linhas de frente invasivas em carcinomas de pele de camundongos induzidos quimicamente, cuja expressão está associada ao grau de metástases em linfonodos de cânceres humanos de mama. Além do mais, a expressão embriônica de Snail, o fator de transcrição Slug relacionado, e Goosecoid é induzida por sinais contextuais, como TGF- β e Wnts, conhecidos por serem responsáveis pela indução da conversão de EMT em células tumorais de camundongos. Twist é expressado durante a gastrulação de embriões de *Drosophila* (veja a Figura 14.26B) e migração das células neuroepiteliais para fora da crista neural de embriões de cordados. Sua expressão é também induzida pela exposição a TGF- β .

Cada vez mais as evidências associam alguns desses fatores de transcrição a vários tipos de malignidade em humanos. Por exemplo, a expressão de Snail foi encontrada em ilhas de células de carcinoma do ducto mamário humano que não expressam E-caderina. Slug tem também sido implicado na repressão da expressão de E-caderina em cânceres de mama humanos (Figura 14.28A). Twist é expressa em altos níveis em muitos carcinomas lobulares mamários invasivos e, em uma extensão menor, em células de carcinoma invasivas do ducto (Figura 14.28B). Similarmente, Twist é expressa, de preferência, em um subtipo “difuso” de carcinoma gástrico e, em menor extensão, no subtipo “intestinal” de carcinomas gástricos, nos quais a expressão de Sip1 – outro TF indutor de EMT – é elevada (Figura 14.28C). Significativamente, ambos, Twist e Slug, capacitam células a resistirem a apoptose e *anoikis* e protegem células em metástase de alguns estresses fisiológicos que poderiam normalmente causar sua morte antes de chegarem a tecidos distantes e formarem micrometástases.

Essas associações não têm sido bem-estudadas sistematicamente e, em cada evento, mesmo quando observadas, elas não provam definitivamente que vários TFs estão envolvidos na

programação invasiva e metastática de células tumorais humanas. Ainda, parece provável que, uma vez que alguns desses TFs sejam expressados em células de câncer, eles ajam separadamente ou em colaboração para orquestrar as modificações celulares complexas associadas a invasão e metástase (Figura 14.29; veja também a Figura 14.15). Finalmente, deveria se observar que o forte paralelo entre EMTs embrionárias e aquelas contribuindo para a patogênese do câncer é estendido por similaridades nas vias de sinalização que são ativas nessas duas situações (Figura 14.30).

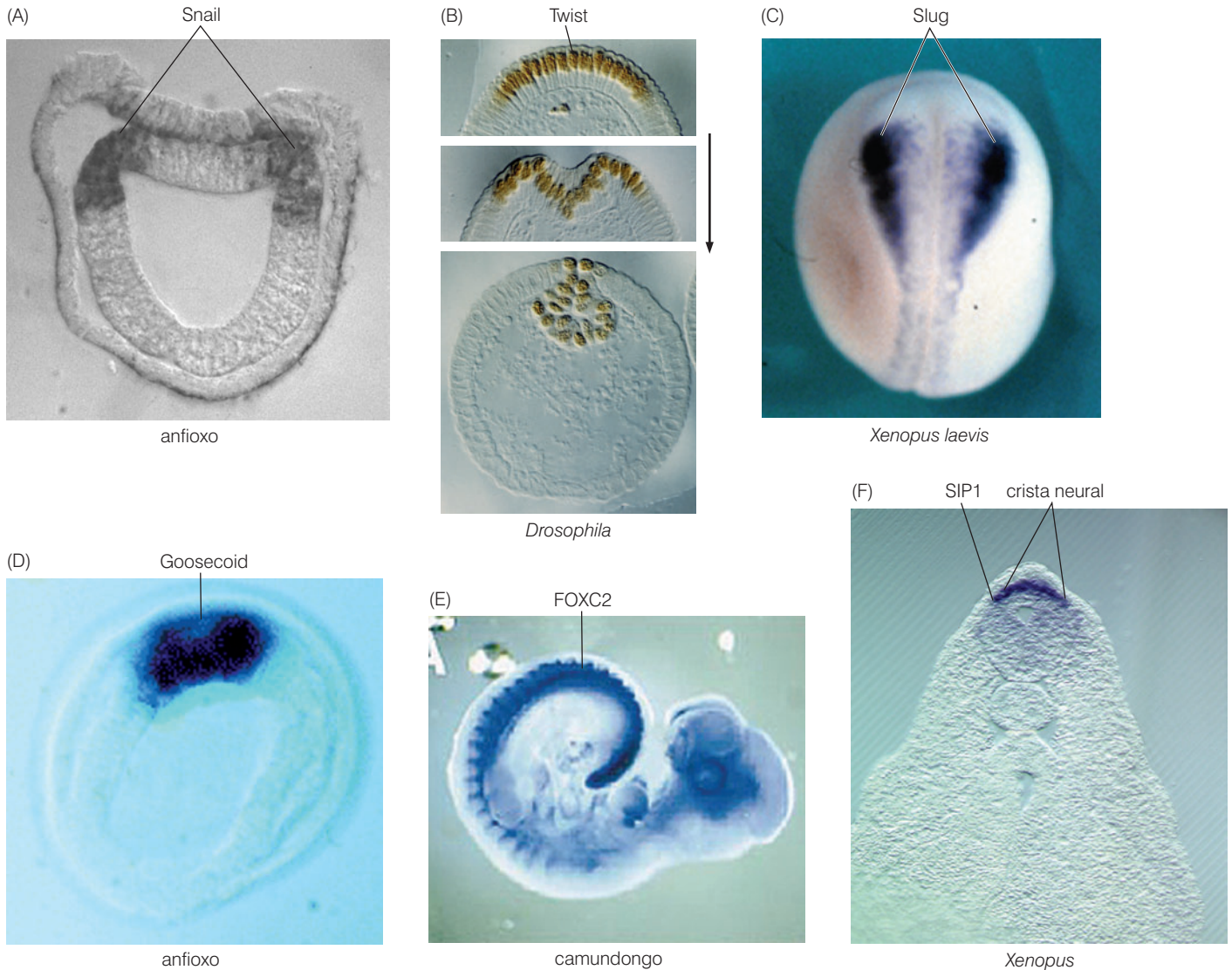
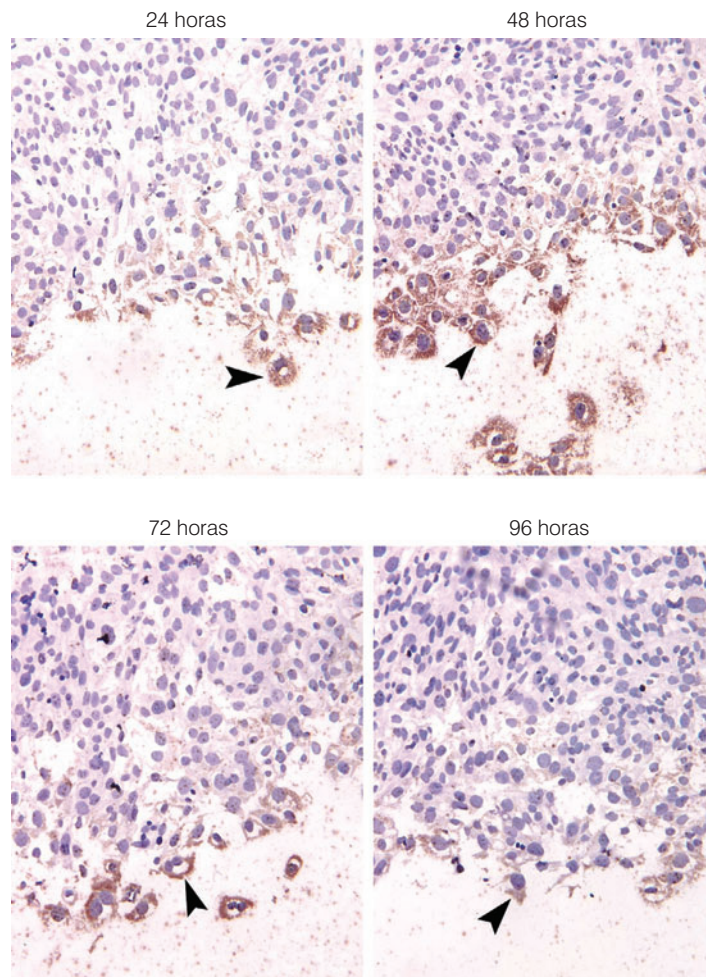


Figura 14.26 Fatores de transcrição embrionários que programam transições epiteliais-mesenquimais (A) O fator de transcrição Snail (TF), que pode programar EMT, é mostrado sendo expressado em *Amphioxus*, um cordado primitivo, nas células (áreas escuras) que são duplicatas das células em cordados mais evoluídos, que formarão a crista neural. (B) Twist TF, que também pode programar EMT, é mostrada aqui (marrom) em um embrião inicial de *Drosophila* no local da gastrulação, a qual ajuda a orquestrar. (C) Slug TF, um parente próximo de Snail, é também expressado em crista neural embrionária. Aqui sua expressão pode ser visualizada (azul-escuro) na crista neural de um embrião de *Xenopus laevis*, o sapo africano. (D) Goosecoid TF é expressado no lábio do blastoporo em gastrulação de embriões de cordados. Nesta imagem, sua expressão, que é induzível pela via de sinalização TGF- β , é mostrada adjacente ao blastoporo oito horas após a fertilização de um ovo de anfioxo. (E) FOXC2

TF, previamente conhecido como Forkhead-1 do mesênquima, é expresso em importantes estruturas mesodermas no dia 9,5 do embrião de camundongo, incluindo o mesoderma ao redor da coluna vertebral em desenvolvimento, bem como os somitos, que são precursores de muitos músculos do corpo. (F) Em *Xenopus laevis*, a expressão de SIP1 TF pode ser vista em crista neural e tubo neural, em que parece ser responsável pelos movimentos da célula que levam ao fechamento do tubo neural e emigração das células da crista neural para outras partes do corpo. (A, cortesia de J. Langeland; B, M. Leptin, J. Casal, B. Grunewald e R. Reuter *Dev. Suppl.* 22-31, 1992. © The Company of Biologists; C, cortesia de C. LaBonne; D, A.H. Neider, G. Panopoulou e J.A. Langeland, *Evol. Dev.* 2: 303-310, 2000; E, T. Furumoto, N. Miura, T. Akasaka et al., *Dev. Biol.* 210: 15-29, 1999; F, de L. van Grunsven, C. Papin, B. Avalosse et al., *Mech. Dev.* 94: 189-193, 2000.)

Figura 14.27 Expressão transitente de um fator de transcrição que induz EMT em cicatrização de ferimento A expressão do fator de transcrição Slug é induzida transientemente em uma monocamada de queratinócitos feridos por raspagem celular. Como visto nesta figura, 48 horas após o ferimento, os queratinócitos na margem do ferimento induzem expressão de Slug (*marrom-escuro*), separando-se da monocamada e começando a fazer seu caminho para o local do ferimento (*parte inferior de cada painel*) com o objetivo de reconstruir uma monocamada intacta. Por 96 horas, muitas dessas células param de expressar Slug e se tornam integradas na monocamada contínua. (Cortesia de P. Savagner, L. Hudson e D. Kusewitt.)



Essas descrições das moléculas que contribuem nas vias-chave para a invasividade das células de carcinoma são remanescentes de nossa discussão, no capítulo anterior, sobre o estroma ativado e sua contribuição para a tumorigenicidade de células de carcinoma. Em ambos os locais, por exemplo, são encontradas caderinas, EMT e TGF- β . Essas conexões dão uma pista para uma idéia interessante mas ainda especulativa: talvez a formação de carcinomas primários e a aquisição de invasividade não sejam separadas e distintas como muitas descrições de câncer poderiam sugerir. Embora possa ser conveniente tratá-las como conceitos separados, a realidade biológica é absolutamente diferente. É possível que a invasividade das células de câncer seja uma extensão natural – de forma exagerada – dos processos de transformação celular que levam inicialmente à formação de muitos tipos de tumores primários. Como invasividade e transformação dependem de muitos dos mesmos circuitos regulatórios e proteínas efetoras, elas poderiam permanecer num contínuo no qual um processo se funde com o próximo.

Para resumir, a descoberta de fatores de transcrição que induzem EMT sugere ao menos três importantes idéias sobre progressão da malignidade. Primeiro, muitos fenótipos de células malignas podem ser induzidos por mudanças não-genéticas – sinais heterotípicos de origem estromal – mais do que por mudanças genéticas ocorrendo em células de carcinoma. Segundo, células de câncer não necessitam de conserto junto a todos os fenótipos associados a células altamente malignas; ao contrário, um número alto de características associadas à malignidade poderia ser adquirida concomitantemente porque esses TFs, uma vez expressados, agem de modo pleiotrópico. Terceiro, a expressão desses TFs e a EMT resultante é dependente de sinalização heterotípica do estroma de tumores primários, e células de carcinoma po-

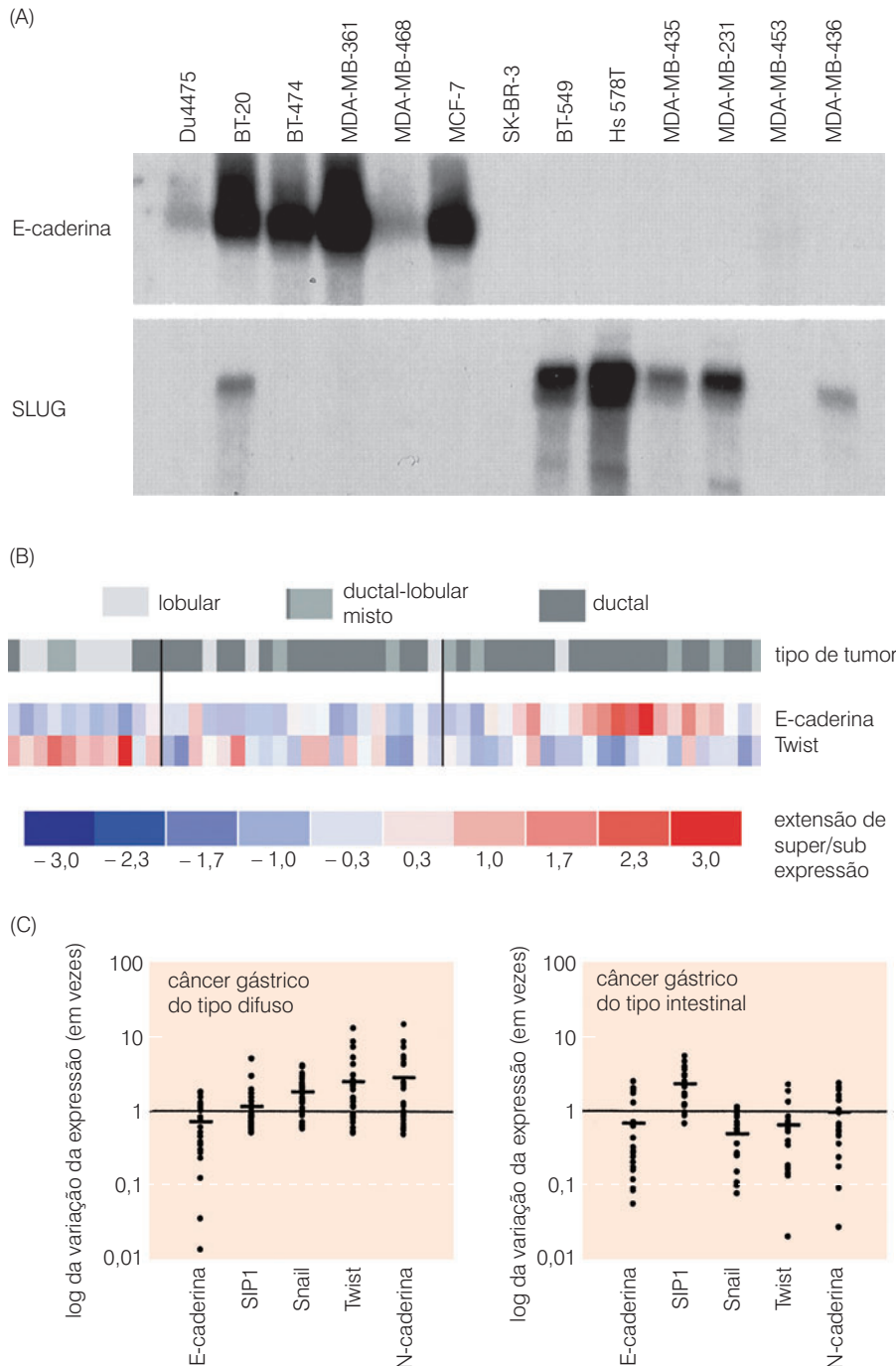


Figura 14.28 Expressão de fatores de transcrição embrionários indutores de EMT em tumores humanos. Evidências ainda fragmentadas implicam um número de fatores de transcrição embrionários (TFs) na indução de EMT (e associados à perda de E-caderina) em células de câncer humano. (A) Esta análise de expressão de transcritos de mRNA em um painel de linhagem de cânceres de mama humano indica que Slug está presente em linhagens de células tumorais em que falta E-caderina; reciprocamente, E-caderina em geral está presente em linhagens de tumor nas quais falta a expressão desse TF. Esses padrões inversos de expressão são provavelmente devidos à habilidade de Slug em ligar-se a uma sequência *E-box* no promotor de E-caderina e potencialmente reprimir a transcrição desse importante gene epitelial. (B) A análise da expressão demonstra que a expressão de Twist varia inversamente com relação à expressão de E-caderina nesses carcinomas de mama humanos. Uma vez que Twist pode reprimir a expressão do gene *CDH1* 250 vezes em cultura de células, Twist é o provável responsável pela perda do mRNA de E-caderina, que é perdido preferencialmente nos carcinomas lobulares invasivos mais agressivos de mama, mas está presente em níveis significativos em carcinomas de ducto invasivos menos agressivos. (C) A análise dos níveis de mRNA de três TFs indutores de EMT – SIP1, Snail e Twist – revelou que, no subtipo “difuso” de câncer gástrico, a expressão de Snail e Twist é significativamente elevada, como a expressão de N-caderina, um marcador mesenquimal. Em contraste, no subtipo “intestinal” de carcinoma gástrico (que é muito diferente em sua etiologia e comportamento biológico), a expressão de SIP1 é elevada, e os mRNA de outros TFs são tanto reprimidos como expressados em nível basal, visto na mucosa gástrica normal. Observações como essas indicam que TFs indutores de EMT agem em várias combinações em diferentes tipos de cânceres humanos para programar o crescimento invasivo. Note a escala logarítmica na ordenada. (A, de K.M. Hajra, D.Y. Chen e E.R. Fearon, *Cancer Res.* 62: 1613-1618, 2002; B, de J.Yang, S.A. Mani, J.L.Donaher et al., *Cell* 117:927-939, 2004; C, de E. Rosivatz, I. Becker, K. Specht et al., *Am. J. Pathol.* 161: 1881-1891, 2002.)

dem reverter do estado mesenquimal para o estado epitelial uma vez que tenham deixado o tumor primário e aportado em um novo microambiente estromal, como aqueles presentes em locais de metástase.

14.6 Proteases extracelulares desempenham papéis importantes na invasividade

A transição epitelial-mesenquimal (EMT) representa um complexo programa biológico que permite às células de câncer adquirir atributos de invasividade e mobilidade. Com o objetivo

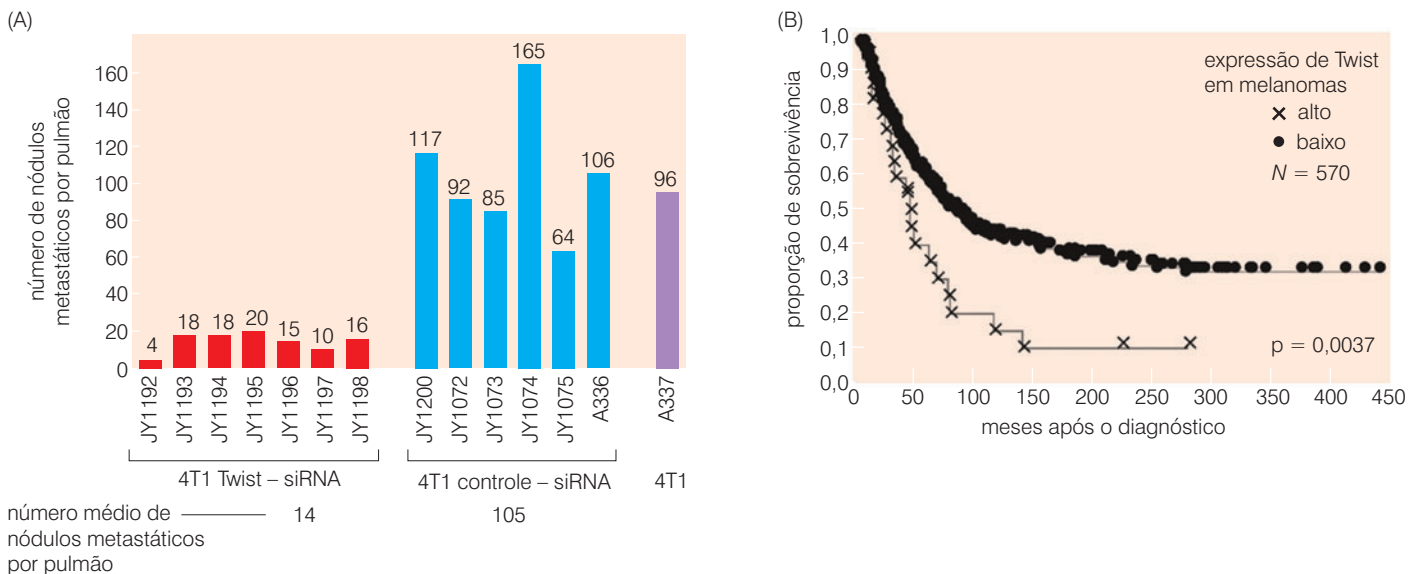
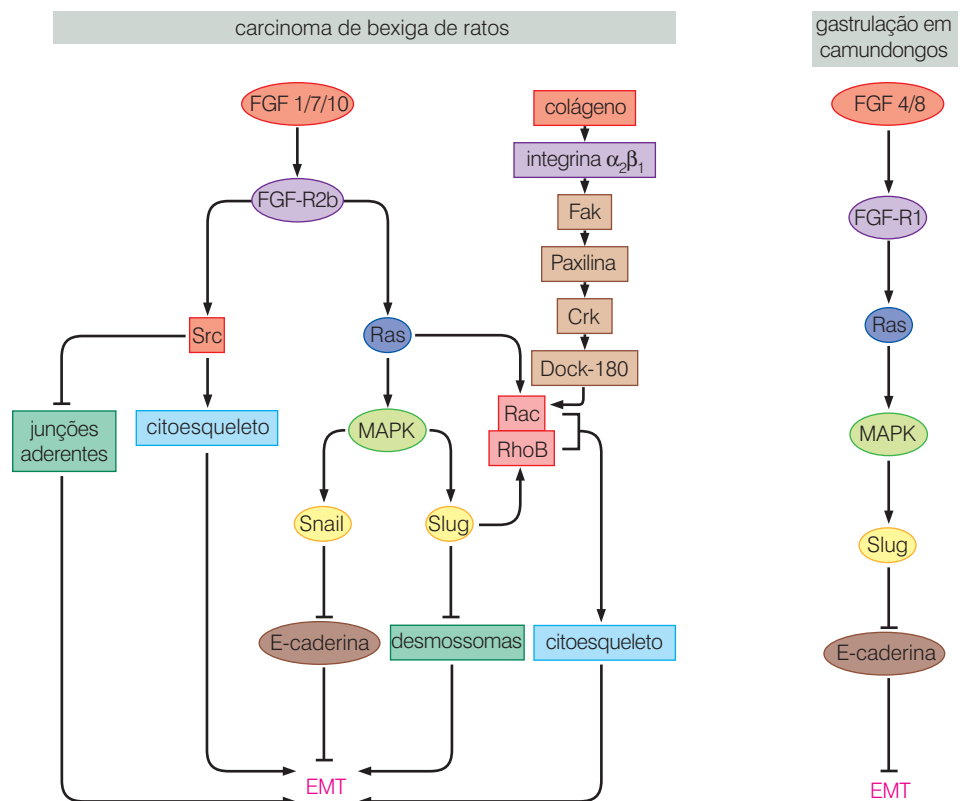
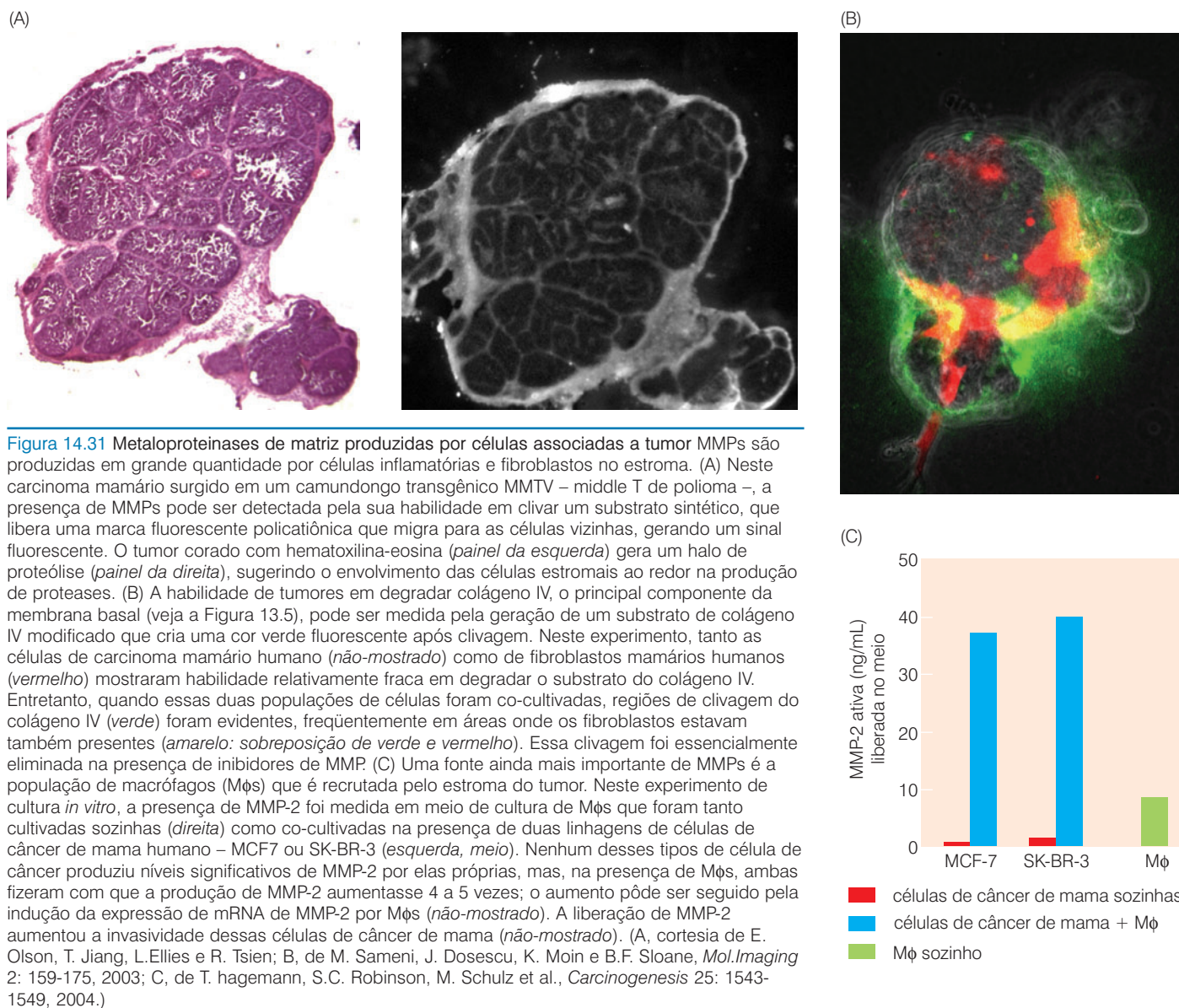


Figura 14.29 Fatores de transcrição embrionários e progressão tumoral. Evidências de que vários fatores de transcrição embrionários agem causando a progressão da malignidade em humanos é ainda fragmentada e indireta. (A) Células de câncer de mama de camundongo 4T1, quando implantadas subcutaneamente em um camundongo hospedeiro, geram grande número de metástase em pulmão (barra roxa, direta). Esse número não é afetado quando essas células de câncer são infectadas por um vetor de retrovírus controle (barras azuis). Entretanto, quando células de câncer foram privadas da expressão de Twist pela infecção com um vetor viral expressando siRNA (que causa a degradação do mRNA de *Twist*), o crescimento resultante de tumores primários não foi afetado, mas o número de metástases gerado foi bastante (~ 85%) reduzido (barras vermelhas).

Significativamente, essas poucas metástases formadas (barras azuis) continuaram a expressar altos níveis de Twist, indicando que elas derivam das células do tumor primário no qual os níveis de mRNA de Twist nunca foram propriamente suprimidos. Cada barra representa um camundongo contendo tumor. Cada barra representa a metástase contida em um único camundongo. (B) A expressão de Twist foi medida em um grande grupo de melanomas por imuno-histoquímica. Como visto neste gráfico de Kaplan-Meier, aqueles pacientes cujos tumores expressaram elevados níveis de Twist ficaram em pior situação quando comparados com aqueles cujos tumores mostraram baixos níveis basais de Twist. (A, de J. Yang, S.A. Mani, J.L. Donaher et al., *Cell* 117: 927-939, 2004; B, de K. Hoek, D.L. Rimm, K.R. Williams et al., *Cancer Res.* 64: 5270-5282, 2004.)

Figura 14.30 Similaridades entre a sinalização de EMT durante a embriogênese e progressão tumoral. Cascatas de sinais de transdução que são responsáveis pela ativação da transição epitelial-mesenquimal (EMT) em um modelo de carcinoma em bexiga de ratos (esquerda) e durante a gastrulação primária na embriogênese de camundongos (direita) têm semelhanças surpreendentes. Essas similaridades proporcionam apoio futuro para a noção de que o programa EMT expressado por células de carcinoma invasivo representam uma reativação de programas biológicos celulares latentes, muitos dos quais são normalmente ativos em desenvolvimento embrionário primário em mamíferos. (De J.P. Thiery, *Nat. Res. Cancer* 2: 442-454, 2002.)





de propriamente apreciar os processos que, juntos, constituem EMT, necessitamos examinar o papel de alguns desses *efetores-chave* – proteínas que funcionam para criar fenótipos associados a EMT. Para começar, examinamos a mais óbvia característica das células malignas – sua habilidade em invadir camadas celulares adjacentes. Para tanto, células de câncer devem remodelar o tecido do ambiente que as circundam, escavando passagens através da matriz extracelular (ECM) e empurrando algumas células que permanecerem no seu caminho.

O efector mais importante dessas mudanças complexas são as metaloproteínases de matriz (MMPs; veja a Tabela 13.1). Em carcinomas, o grande volume dessas proteases é secretado por células estromais recrutadas, notavelmente macrófagos, mastócitos e fibroblastos, mais do que por células epiteliais neoplásicas (Figura 14.31). Dissolvendo a densa quantidade de moléculas de ECM que rodeiam e confinam células individuais dentro de tecidos, MMPs criam espaços para essas células se moverem. Incluídos entre os componentes de ECM que são clivados por MMPs estão fibronectinas, tenascina, laminina, colágenos e proteoglicanos. Durante o curso de degradação dos componentes de ECM, MMPs também mobilizam e ativam certos fatores de crescimento que têm sido mantidos na forma inativa para ECM ou superfície celular.

MT1-MMP (MMP de membrana tipo-1) é um dos seis tipos de MMP ancorados em membrana e, portanto, limitado a clivar substrato de proteínas na vizinhança imediata da célula que a produz. Das 187 metaloproteínas conhecidas, codificadas pelo genoma humano, 28 são MMP secretadas. Em contraste à MT1-MMP, que age como uma enzima ligada à membrana do plasma, muitas das MMPs funcionam como enzimas solúveis nos espaços intercelulares. MT1-MMP pode atacar e clivar moléculas de adesão da superfície celular, como caderinas e integrinas, bem como receptores de fatores de crescimento e quimiocinas. Ela também pode clivar **proenzimas** inativas, como pró-MMP2, em MMPs enzimaticamente ativas.

Essas proteases secretadas claramente têm importantes papéis na sobrevivência celular normal e na proliferação. Apesar disso, cada vez que uma célula dentro de um tecido normal entra em um ciclo de crescimento e divisão, o espaço dentro da ECM deve ser cavado para a futura célula-filha, e, uma vez que as duas estão formadas, cada uma dessas células deve, por sua vez, construir uma nova ECM ao seu redor. Ainda, a remodelagem da ECM ocorre continuamente em tecidos com atividade mitótica. Conseqüentemente, melhor do que gerando aberrações em células de câncer invasivas, as atividades de MMPs e outras proteases extracelulares, como o ativador de plasminogênio tipo urocinase (uPA), acompanham e participam de proliferação em célula normal. Cabe salientar que existem experimentações clínicas de certas drogas inibidoras de MMP, determinadas devido aos efeitos desses inibidores em uma variedade de tecidos normais; como esses agentes suprimem o *turnover* normal de cartilagem e outros componentes de junção, eles criaram insuportáveis níveis de rigidez nas juntas e dor.

Cada tipo de MMP geralmente age em um conjunto bem-definido de substratos (veja a Tabela 13.1), fazendo-o de um modo altamente regulado e localizado. É provável que essas enzimas continuem a mostrar cada substrato especificamente durante o processo de invasão da célula de câncer. De fato, nesse exemplo, a proteólise parece proceder continuamente melhor do que nas breves “explosões” que acompanham o crescimento e a divisão de células normais.

Uma das conseqüências da EMT programada por muitos bem-estudados fatores de transcrição embrionários (Seção 14.5) é a síntese induzida e liberação de MMPs de células de carcinoma, notavelmente MMP-2 e MMP-9. De fato, parece claro que o volume de MMPs encontrado em tumores originaram-se do estroma. Por exemplo, a metaloproteínase de matriz melhor estudada, MMP-9, é muito expressa por macrófagos (Seção 13.5), neutrófilos e fibroblastos na linha de frente invasiva de tumores. A expressão de MMP-9 nessas frentes correlaciona-se positivamente com a habilidade metastática do tumor primário, sugerindo que MMPs, como MMP-9, podem agir em muitos estágios da cascata invasão-metástase, incluindo invasão local do estroma do tumor primário, intravasação e extravasação. Ensaios *in vitro* indicam que MMP-9 pode degradar colágenos que são componentes proeminentes da ECM, incluindo membrana basal, especificamente colágenos dos tipos IV, V, XI e XIV. Outros alvos de MMP-9 incluem laminina (outro importante constituinte da membrana basal; veja a Figura 13.5), quimiocinas, fibrinogênio e TGF- β latente. No caso dos dois últimos, a clivagem por MMPs converte-os da forma latente para a forma ativa.

As funções extensamente variadas de MMPs indicam que sua atividade enzimática deve ser firmemente controlada, ao menos em tecido normais. Refletindo tal exigência, está o fato de que MMPs solúveis, como MMP-9, são todas inicialmente sintetizadas como proenzimas inativas que podem funcionar apenas como caspases (Seção 9.13), seguindo a ativação por outras proteases. A regulação negativa é também providenciada por uma classe de proteínas chamadas de inibidores teciduais de metaloproteínases (TIMPs), que ligam as MMPs colocando-as em uma configuração inativa (Seção 13.9). Além disso, as atividades de algumas dessas proteases extracelulares parecem ser confinadas por meio das suas concentrações em focos discretos, chamados **podossomas**, em que MMPs ligadas à membrana, notavelmente MT1-MMP, são ativas em criar áreas altamente localizadas em proteólise (Figura 14.32).

Enquanto MMPs têm sido descritas como efetores diretos de passos específicos em invasão e metástase, parece claro que a desregulação de MMPs pode, por meio de mecanismos desconhecidos, dirigir a progressão de células através de todos os estágios de múltiplas etapas da tumorigênese, incluindo a finalização da cascata de invasão – a metástase.

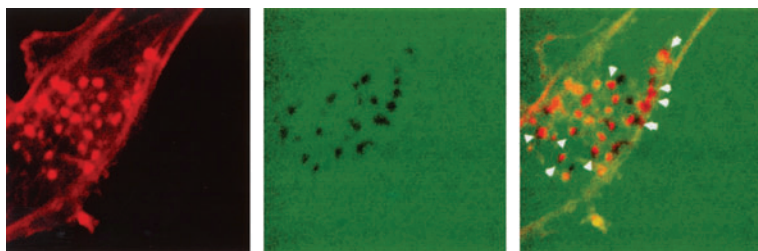
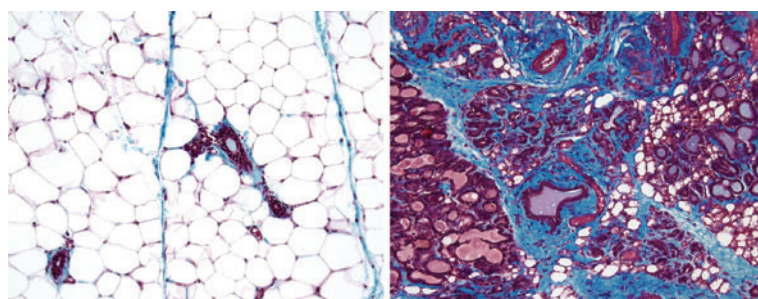


Figura 14.32 Podossomas e a degradação focal da matriz extracelular. Podossomas são pequenas protrusões focais da superfície celular que são exibidas por muitos tipos de células e usadas por tais células para degradar áreas localizadas de matriz extracelular (ECM) na sua vizinhança imediata. Podossomas são usadas por células de câncer invasivas para controlar diretamente a degradação de ECM perto da margem dianteira da célula invasiva; quando vistas nesse contexto, elas são algumas vezes chamadas "invadossomas". Nesta figura, células foram coradas para fibras de actina com o corante faloidina (vermelho, esquerda da micrografia), revelando vários discretos conjuntos de actina associados a podossomas, localizados na superfície ventral (lado inferior) desses fibroblastos de rato *src*-transformados. Essas células foram crescidas em uma camada da proteína fibronectina de ECM, acoplada com o corante FITC (verde, meio), revelando que, diretamente abaixo dos podossomas, discretos orifícios (preto) corroeram camadas de fibronectina, pela ação ostensiva de proteases associadas a podossomas, como MMP-MT1. A sobreposição direta entre conjuntos de actina dos podossomas e orifícios corroídos na fibronectina é indicada por cabeças de setas brancas no painel da direita. (De K. Mizutani, H. Miki, H. He et al., *Cancer Res.* 62: 669-674, 2002.)

Então, quando a expressão de MMP-3 (também conhecida como estromelisina-1) é forçada na glândula mamária de camundongos transgênicos, esses camundongos inicialmente desenvolvem hiperplasia mamária (Figura 14.33). Alguns desses crescimentos progridem para carcinomas que, por fim, tornam-se invasivos e metastáticos. Esses camundongos revelam o quão crítica é a regulação da ação de MMP e porque ela deve ser mantida sob controle em tecidos normais.

A complexidade da rede regulatória que governa a ativação de MMP é ilustrada mais adiante pelo comportamento do ativador de plasminogênio tipo urocinase (uPA). uPA é secretado por células estromais como uma proenzima inativa. Esta forma de uPA procede ligando-se ao seu próprio receptor de superfície celular (chamado uPAR), que é exibido por células epiteliais, incluindo as malignas, tornando-se então cataliticamente ativa (Figura 14.34). O uPA ligado, ativado, pode então ser utilizado pelas células epiteliais para clivar uma variedade de substratos extracelulares na sua vizinhança imediata. Importante entre eles está uma série de proenzimas de outras proteases extracelulares que são ativadas por essa clivagem. Por exemplo, clivando o **plasminogênio** em plasmina, uPA cria uma protease ativa que, por sua vez, procede clivando e ativando formas de pró-enzimas de ainda outras proteases extracelulares, notavelmente, metaloproteínases de matriz (MMP) dos tipos 1, 2, 3, 9 e 14. De maneira alternativa, uPA pode clivar e ativar algumas MMPs diretamente. Não surpreendentemente, inibidores do complexo uPA-uPAR têm sido encontrados bloqueando tanto crescimento quanto metástase de tumor em modelo animal de patogênese de câncer. Além disso, altos níveis de uPAR solubilizados em soro representam um mau prognóstico para pacientes com câncer.

Esses breves comentários sobre proteases e suas contribuições para invasividade de células de câncer descrevem apenas uma pequena parte do que certamente é uma rede muito complexa de interações entre proteases e substratos. O número total de proteases produzidas por células de mamíferos é enorme e compete com o número de proteínas que formam o circuito de processamento de sinais intracelulares altamente complexo, descrito no Capítulo 6. Até o momento, as funções de apenas uma pequena porção dessas enzimas foi estudada no contexto da patogênese do câncer.

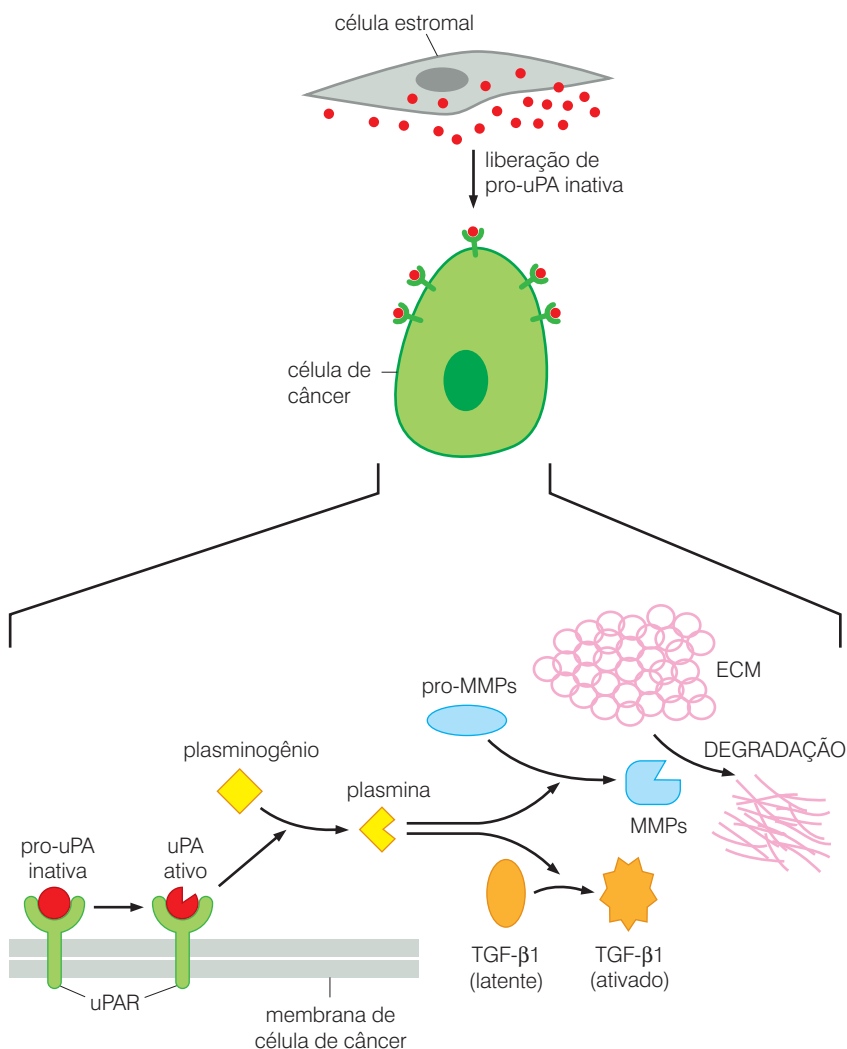


mama normal

+MMP-3 ectópica

Figura 14.33 Expressão ectópica de MMP-3 e progressão do tumor mamário. A glândula mamária de camundongo normal (painel da esquerda) é composta por ductos em repouso (roxo) e tecido adiposo abundante (branco, células preenchidas com lipídeo), bem como colágeno (azul-claro). Entretanto, quando o gene que codifica MMP-3 (também conhecido como estromelisina-1) é expresso constitutivamente como um transgene que dirige sua expressão para o epitélio mamário, os camundongos desenvolvem hiperplasia abundante (painel da direita), incluindo extensivas ilhas de células epiteliais hiperplásicas (roxo) formando ductos, bem como como um estroma fibrótico, rico em colágeno (azul-claro) e adipócitos anormais (estruturas ovais brancas, direita, abaixo). Muitas dessas áreas subseqüentemente progridem para tumores metastáticos invasivos (não-mostrado). (De M.D. Sternlicht, A. Lochter, C.J. Sympton et al., *Cell* 98: 137-146, 1999.)

Figura 14.34 uPA, uPAR e a ativação de proteínas extracelulares A proenzima forma inativa do ativador do plasminogênio urocinase (pró-uPA) é liberada por células estromais. Uma vez liberada, liga-se ao seu receptor cognato, uPAR, que é exibido na superfície das células epiteliais; essa ligação converte uPA em uma protease cataliticamente ativa. Receptor ativo ligado a uPA pode então converter plasminogênio solúvel inativo na forma plasmina ativa; as últimas funções como protease para clivar formas proenzima de metaloproteinasas de matriz (pro-MMPs) em MMPs ativas e TGF- β 1 latente na sua forma ativa. Ao mesmo tempo, há evidência de que uPA pode também agir diretamente em pro-MMPs, convertendo-as em proteases ativas. (De F. Blasi e P. Carmeliet, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3: 932-943, 2002.)



14.7 Pequenas GTPases tipo-Ras controlam processos celulares incluindo adesão, forma celular e mobilidade

A ação das proteases extracelulares, notavelmente as MMPs, explica em nível bioquímico que vias são justificadas para o avanço das células de câncer invasivas através da matriz extracelular e, então, através dos tecidos. Elas falham, entretanto, em indicar como células de câncer individuais tomam vantagens dessas vias para se moverem. O comportamento de mobilidade das células tem sido estudado extensivamente com células em cultura e presume-se que o espalhamento destas em substratos sólidos *in vitro* reflita o comportamento *in vivo* de células de câncer de quando invadem camadas celulares vizinhas e intravasam. Essa mobilidade é presumivelmente importante para as células de câncer escaparem dos vasos sanguíneos ou ductos linfáticos – processo de extravasação.

O comportamento móvel pode ser induzido em cultura de células pela exposição destas a uma variedade de fatores de crescimento. (A habilidade desses fatores em induzir locomoção é algumas vezes reconhecida pela designação dela como sendo **motogênica** além de mitogênica.) No caso de células epiteliais, o melhor indutor de mobilidade em geral é o fator de crescimento de hepatócito (HGF); esta proteína é também chamada fator de espalhamento (SF), em reconhecimento à sua habilidade em induzir movimento multidirecional de células em cultura de monocamadas. Muitos – ou talvez todos os – tipos de células epiteliais expres-

sam Met, o receptor para HGF, e muitos desses tipos celulares adquirem mobilidade em resposta ao tratamento com HGF (veja a Figura 14.24A). De modo similar, EGF é claramente hábil em induzir mobilidade de células de câncer de mama (Figura 14.23B).

A maquinaria celular que responde a sinais motogênicos e opera como um motor da mobilidade é extraordinariamente complexa em nível molecular. A mobilidade celular envolve contínua reestruturação do citoesqueleto de actina em diferentes partes da célula (Figura 14.35), tão bem quanto montando e quebrando as ligações entre a célula migratória e a matriz extracelular (ECM). (No caso de cultura celular, a ECM em questão é a rede de proteínas que foram previamente colocadas por essas células na superfície da placa de Petri.)

O processo de movimento celular pode ser quebrado em diversas etapas. Para começar, uma célula estenderia seu citoplasma na direção do movimento pretendido. Essa extensão envolve a protrusão da superfície celular da **lamelipódia** – estrutura larga, lisa, tipo fita que poderia ter dez microns de largura, mas apenas 0,1 a 0,2 μm de espessura (Figura 14.36). Ao mesmo tempo, proteases da superfície celular, como as descritas anteriormente, são usadas para degradar seletivamente proteínas da ECM que permanecem na via da “margem principal” da célula migratória. Enquanto isso acontece, a célula desenvolve integrinas para construir novos pontos de ligação entre a lamelipódia e a ECM nessa margem principal e quebra tais adesões dessa margem, liberando então citoplasma e membrana plasmática para a redistribuição da margem principal.

Acredita-se que protrusões da lamelipódia sejam estruturas tipo estacas, chamadas *filopódias*, que permitem o avanço celular para explorar o território ao redor (Figura 14.37). Como a lamelipódia, as filopódias são reunidas por meio da reorganização de fibras de actina, nesse caso, fibras que são empacotadas firmemente junto (abaixo) da membrana plasmática de cada filopódia. O papel preciso executado pelas filopódias em invasividade da célula de câncer permanece por ser elucidado.

A detalhada atividade da forma e mobilidade celular está sob o controle de membros de um grupo de proteínas relacionadas a Ras, pertencendo à família Rho. Como discutido brevemente no Capítulo 6, as proteínas Rho, como Ras, operam como uma troca binária, estando em um estado ativo funcional quando se liga a GTP e em estado inativo uma vez que o GTP

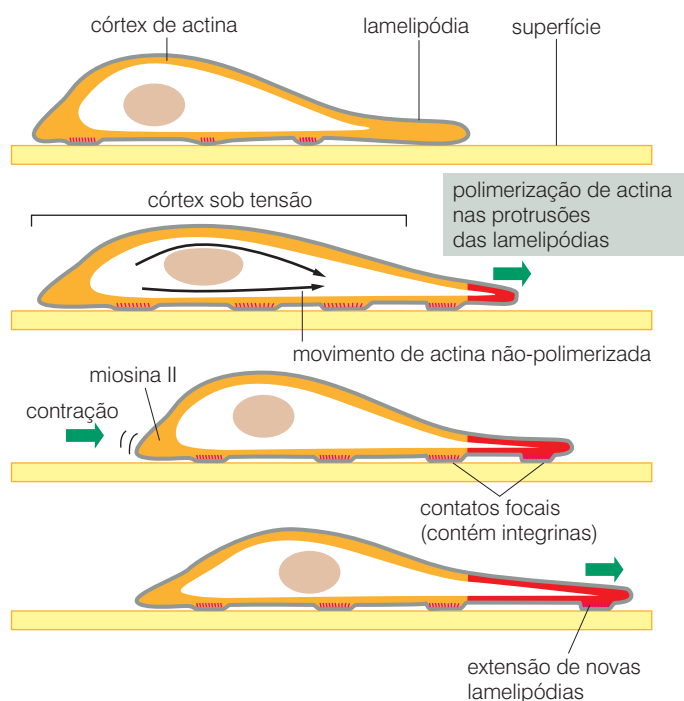


Figura 14.35 Locomoção de células em substrato sólido A locomoção de células em cultura depende da coordenação de uma série complexa de mudanças no citoesqueleto, bem como da produção e da quebra de contatos focais com o substrato sólido. A célula organiza as fibras de actina com o objetivo de estender lamelipódias na sua frente de avanço e estabelecer novos contatos focais. Ao mesmo tempo, fibras de estresse, também consistindo em actina, são usadas para contrair a borda em movimento da célula, na qual contatos focais estão sendo quebrados. A produção e a quebra desses contatos focais (vermelho) dependem da modulação localizada de afinidade de várias integrinas por componentes da matriz extracelular (ECM), representada aqui pela superfície amarela. (De B. Alberts et al., Molecular Biology of the Cell, 4th ed. New York: Garland Science, 2002.)

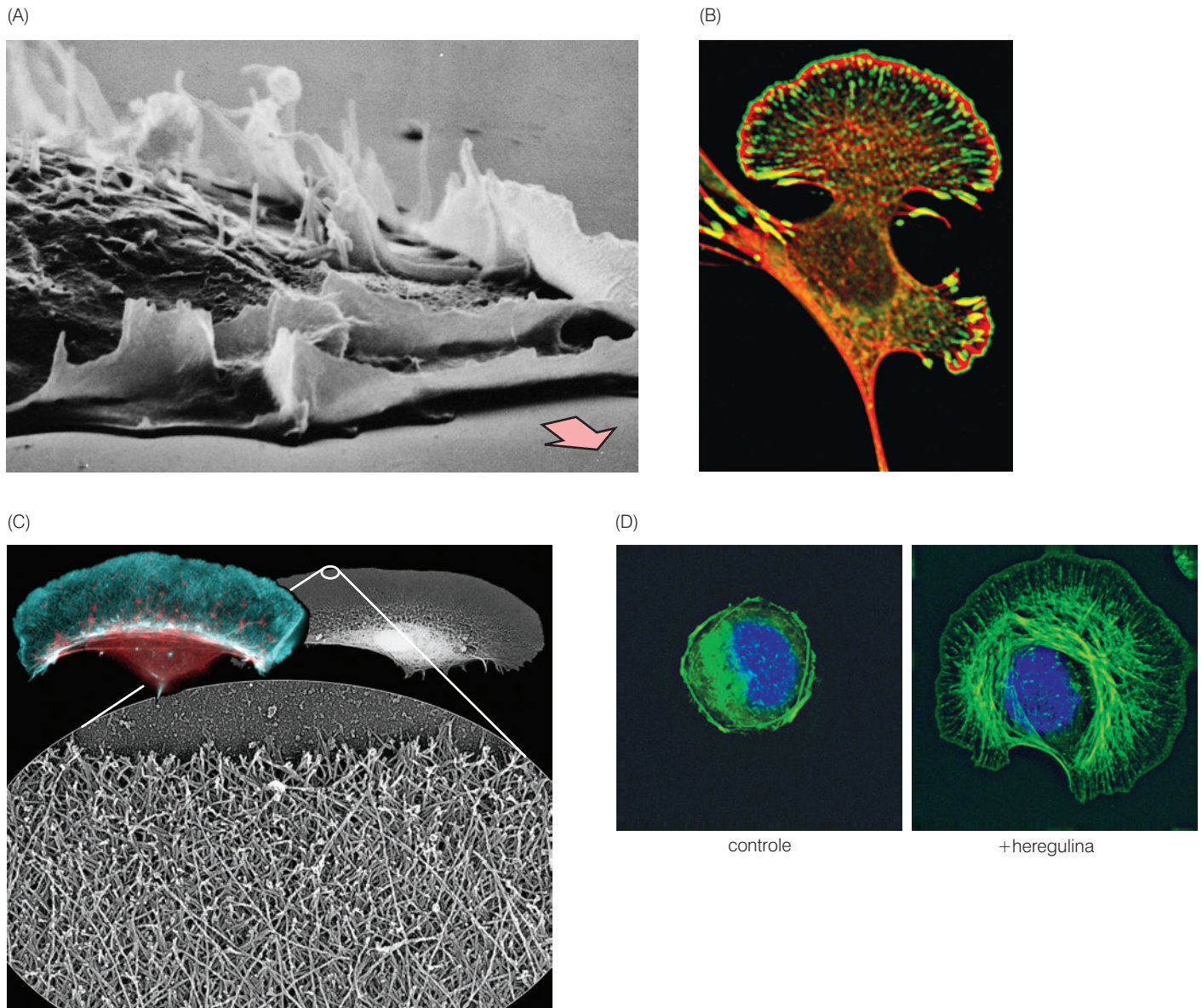


Figura 14.36 Lamelipódia (A) Esta microscopia eletrônica de varredura (SEM) de célula de fígado de rato transformado espontaneamente mostra elaboradas ondas – lamelipódia – que células migrantes estendem na frente de avanço durante a sua locomoção (seta). As lamelipódias têm presumivelmente um papel no avanço de células de câncer invasivas *in vivo*, o qual não foi ainda demonstrado diretamente. As lamelipódias que são estendidas na frente de avanço da célula mas falham em ligar-se ao substrato parecem ser varridas como ondas junto ao lado dorsal (acima) da célula; partes de seus componentes são então reintegradas na ampla membrana do plasma e do citoesqueleto. (B) Esta imagem de micrografia de fluorescência mostra uma lamelipódia sendo estendida por um fibroblasto em antecipação à locomoção. Como visto aqui, as fibras de actina são marcadas com faloidina (vermelho), enquanto a proteína Ena, que programa o avanço do lamelipódia organizando suas adesões focais e suas margens externas, é marcada aqui com a proteína verde fluorescente (GFP), com a qual foi fusionada. (C) Microscopia de fase de um queratinócito de peixe, estudado devido às suas lamelipódias proeminentes, indica a presença de actina substancial em suas protrusões (azul, figura à esquerda, acima). Microscopia eletrônica de cada célula (imagem à direita, acima) e seu citoesqueleto (imagem abaixo) em um aumento muito maior indica uma rede criada densamente de filamentos de

actina que são organizados com o objetivo de estender a lamelipódia na direção do movimento da célula. (D) A formação de lamelipódia e a mobilidade celular resultante é muito estimulada por vários fatores de crescimento e seus cognatos receptores de tirosina cinase. Vistos aqui, estão os efeitos da adição de heregulina, um ligante da família dos receptores erbB2/erbB3, em uma célula de câncer de mama humano. Uma célula de câncer não-tratada está à esquerda, enquanto uma célula exposta a heregulina por 20 minutos está à direita. Citoesqueletos de actina foram corados com verde (usando faloidina acoplada com um flúor), enquanto os núcleos são corados em azul. (Como a heregulina está presente uniformemente no meio ao redor, essa célula foi induzida a desenvolver lamelipódia em todas as direções, em vez de em uma única direção, fonte localizada deste motógeno.) A sinalização aumentada por erbB2 (=HER2/Neu) está correlacionada com o aumento de progressão metastática de células de câncer de mama humano, o qual poderia ser explicado em parte pela indução mediada por receptor da formação de lamelipódia e mobilidade celular associada. (A, cortesia de Julian Heath; B, de J.J. Loureiro, D.A. Robinson, J.E. Bear et al., *Mol. Biol. Cell* 13: 2533-2546, 2002; C, de T.M. Svitkina, A.B. Verkhovsky, K.M. McQuade e G.G. Borisy *J. Cell. Biol.* 139: 397-415, 1997; D, cortesia de A.Badache e N.E. Hynes.)

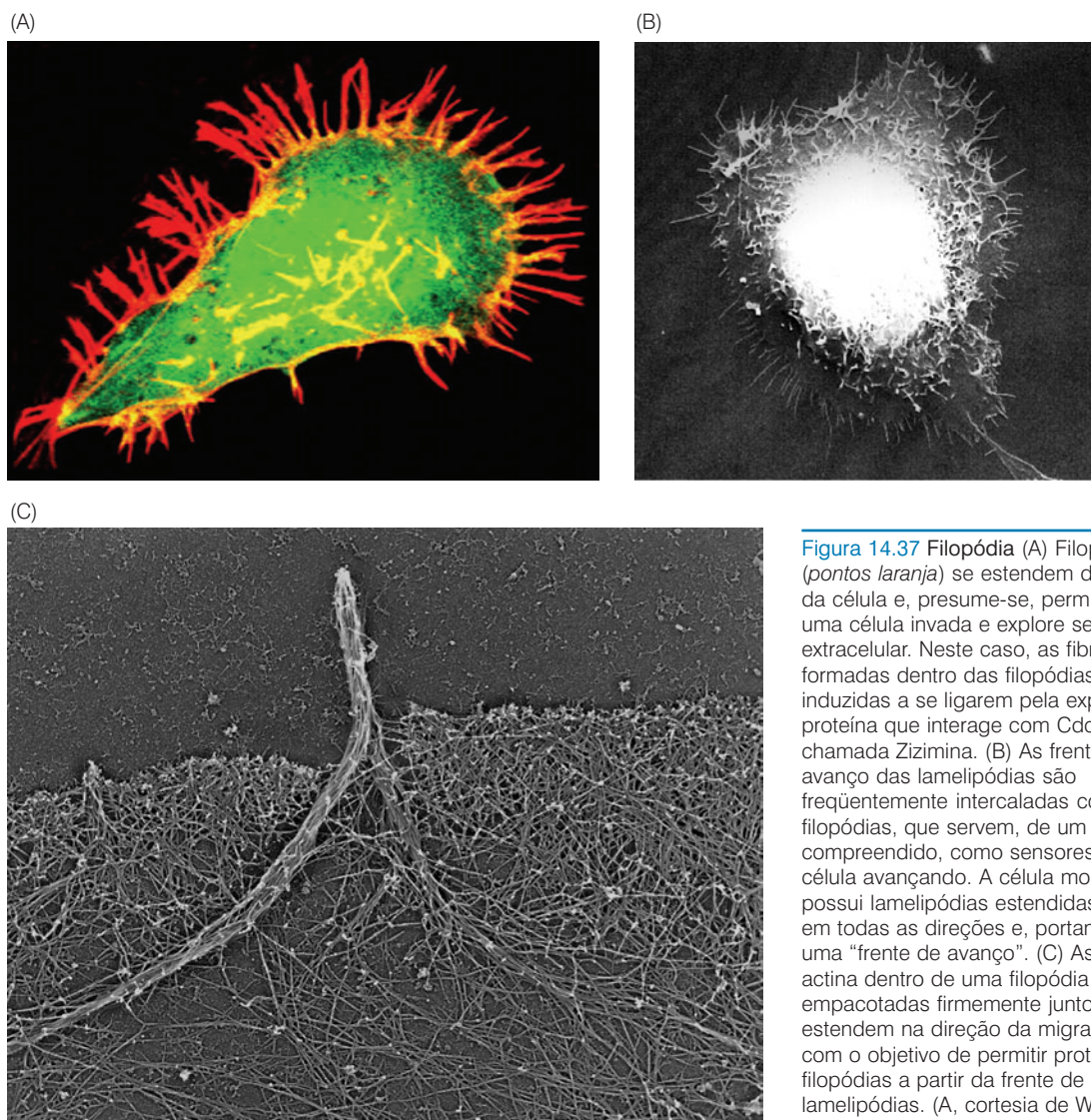


Figura 14.37 Filopódia (A) Filopódias (pontos laranja) se estendem da superfície da célula e, presume-se, permitem que uma célula invada e explore seu ambiente extracelular. Neste caso, as fibras de actina formadas dentro das filopódias foram induzidas a se ligarem pela expressão da proteína que interage com Cdc42, chamada Zizimina. (B) As frentes de avanço das lamelipódias são freqüentemente intercaladas com filopódias, que servem, de um modo pouco compreendido, como sensores para a célula avançando. A célula mostrada aqui possui lamelipódias estendidas e filopódias em todas as direções e, portanto, não tem uma "frente de avanço". (C) As fibras de actina dentro de uma filopódia são empacotadas firmemente junto e se estendem na direção da migração celular com o objetivo de permitir protrusões de filopódias a partir da frente de avanço das lamelipódias. (A, cortesia de W.B. Kiosses e M.A. Schwartz; B, cortesia de E. Bulanova; veja também T.M. Svitkina, E.A. Bulanova, O.Y. Chaga et al., *J. Cell Biol.* 160: 409-421, 2003.)

ligado é hidrolizado a GDP. Mais de 20 membros da família de proteínas Rho foram descobertas em humanos. Eles são divididas em três subfamílias – proteínas Rho propriamente, proteínas Rac e Cdc42. Como as proteínas Ras, muitos membros da família de proteínas Rho carregam grupos lipídicos na sua porção C-terminal, que permitem o ancoramento a membranas intracelulares. Cada uma dessas proteínas têm funções especializadas em reorganizar a forma celular e permitir a mobilidade celular (Figura 14.38).

A Figura 14.38 realmente apresenta de forma inapropriada as ações dessas várias proteínas tipo Rho em um importante aspecto: isto implica que cada uma delas aja globalmente por toda a célula para organizar certas mudanças na configuração do citoesqueleto de actina. Na realidade, elas agem bastante diferentemente. O programa complexo de mobilidade celular depende da ativação *localizada* de cada uma dessas proteínas em pequenos domínios do citoplasma, que, por sua vez, capacitam a célula como um todo a se mover em uma direção ou outra. A alternativa – ativação global – levaria a uma tentativa da célula de se mover simultaneamente em todas as direções, um cenário sugerido pelas lamelipódias das Figuras 14.36D e 14.38C, que formam um anel contínuo ao redor do perímetro inteiro do citoplasma.

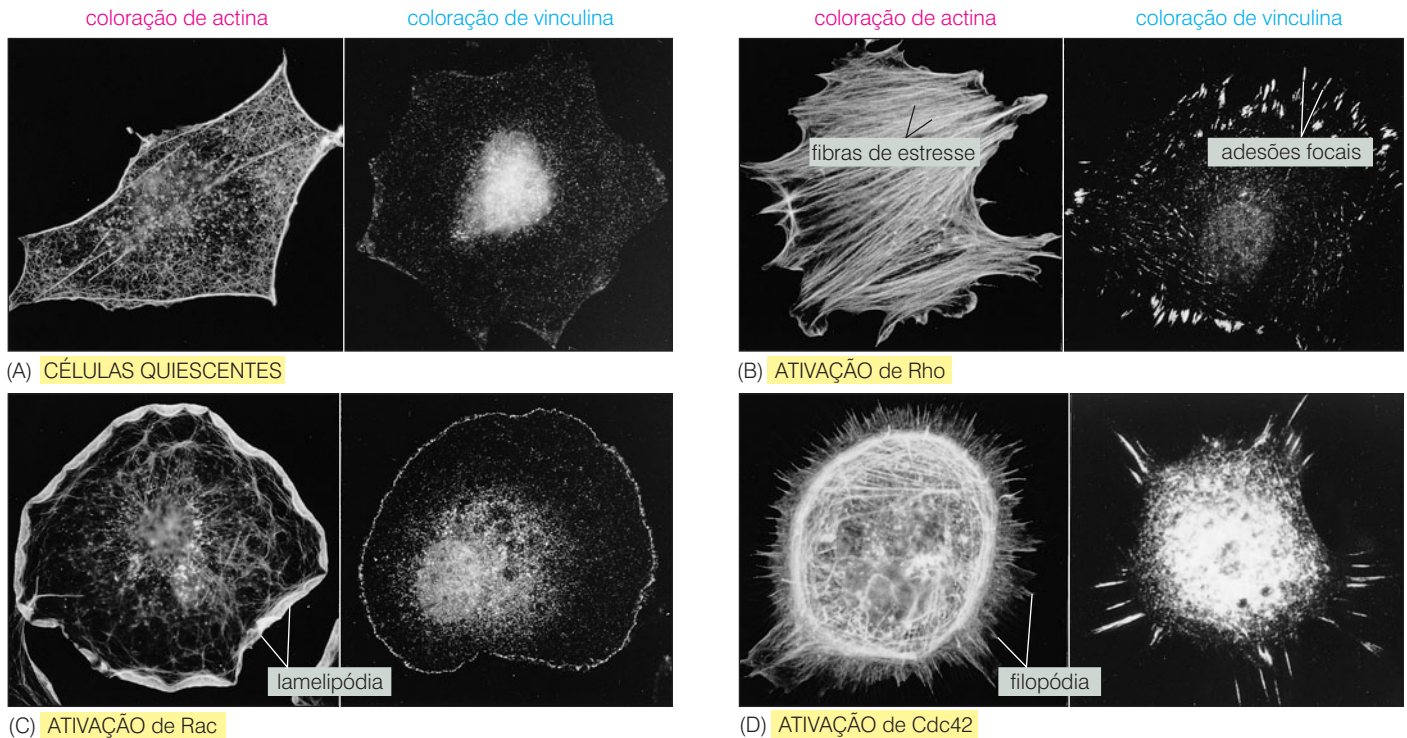


Figura 14.38 Efeitos de proteínas tipo Rho no citoesqueleto de actina e na adesão celular. Membros da família Rho de pequenas GTPases, que consistem nas subfamílias Rho, Rac e Cdc42, controlam tanto o citoesqueleto de actina como a formação de adesões focais, vistas aqui por meio de coloração com um anticorpo antivinculina, uma das proteínas que ligam integrinas às adesões focais desse citoesqueleto (veja a Figura 5.28). As fibras de actina foram marcadas com faloidina fluorescente, um composto com alta afinidade por actina. (A) Fibroblastos 3T3 quiescentes privados de soro servem como controle para os painéis que seguem. (B) Exposição de células ao ácido lisofosfatídico, que especificamente ativa proteínas da subfamília Rho, fazendo com que uma célula construa um grande número de fibras de estresse e adesões focais. (C) A microinjeção de uma forma de proteína Rac constitutivamente ativada em uma célula origina a formação de uma única enorme lamelipódia ao redor de toda a circunferência. (Em contraste, uma fonte focal de sinais ativando Rac provavelmente induz lamelipódia apenas no lado da face dessa fonte.) (D) Microinjeção do fator de troca do nucleotídeo guanina (GEF) de Cdc42 nessas células faz com que uma célula estenda centenas de filopódias em todas as direções. (De A. Hall, *Science* 279: 509-514, 1998.)

(A ativação global da função de Rac nesta célula é um artefato da introdução, por microinjeção na célula, da proteína Rac ativada constitutivamente.)

A ativação do fator de crescimento dos receptores da tirosina cinase leva à ativação de muitos membros de proteínas G da família Rho. Por exemplo, o tratamento de cultura de fibroblastos com o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), um potente mitógeno para essas células, ativa várias proteínas Rho e estimula esses fibroblastos a se moverem no fundo da placa de Petri. Alternativamente, quando os fibroblastos são colocados em cultura tridimensional em suspensão com gel de colágeno, PDGF os induz a penetrar esse gel. Todas as três subfamílias de proteínas Rho (i. e., Rho, Rac e Cdc42) parecem contribuir para essa invasão, enquanto apenas Rac pode ser necessária para o movimento dos fibroblastos através de um substrato sólido em cultura. Esses vários comportamentos também ilustram uma importante diferença entre proteínas Ras e seus distantes parentes da família Rho: em células de câncer, a proteína Ras é freqüentemente ativada por alterações na sua estrutura (mais especificamente, substituições em aminoácidos), enquanto várias proteínas Rho são funcionalmente ativadas por seus reguladores fisiológicos *upstream*.

Nem todas as conexões da sinalização entre receptores de PDGF e proteínas da família Rho são conhecidas. Entretanto, está claro que esses receptores, ativando Ras, estimulam ao menos as vias de sinalização posterior envolvendo efetores Raf, Ral-GEF e PI3K (fosfatidilinositol 3 cinase) (veja as Seções 6.5, 6.6 e 6.7). Além disso, Ras ativada se liga e parece ativar Tiam1, que funciona como um fator de troca do nucleotídeo guanina (GEF) para Rac. (Lembre que GEFs são responsáveis por originar pequenas proteínas G, como Ras e Rho, para liberar ligações GDP e pegar GTP, ativando então a sinalização por essas proteínas G.) Assim, Tiam1 poderia também ser considerada um outro efector Ras.

De fato, da perspectiva da mobilidade celular, PI3K é claramente o mais importante dos efetores Ras. Pela geração de PIP_3 (fosfatidilinositol [3,4,5] trifosfato), a enzima PI3K cria uma estrutura química na face do citoplasma da membrana plasmática na qual uma varieda-

de de proteínas citosólicas pode se ligar via seus domínios PH (Seção 6.6). Entre essas proteínas, existe um número de fatores de troca do nucleotídeo guanina (GEFs) responsáveis pela ativação de membros de proteínas G da família Rho. Essas GEFs-Rho tornam-se ativadas seguindo sua ligação à membrana plasmática.

(O papel fundamental de PI3K e PIP₃ na “coreografia” da mobilidade celular está ilustrada com base em estudos de mobilidade do protozoário *Dictyostelium discoideum*. PI3K e seu produto, PIP₃, estão localizados na margem anterior da célula protista. De modo oposto, PTEN, a enzima que destrói PIP₃ e, portanto, antagoniza PI3K, está localizada na lateral e na parte de trás, revestindo a margem de toda a célula. Isso introduz um outro elemento nessa discussão: enquanto receptores de fator de crescimento, como os PDGF-R, podem liberar sinais encorajando a ativação de PI3K por toda a célula, a real sinalização por essa enzima pode também ser influenciada pela sua localização dentro da célula.)

Tiam1 foi originalmente identificada como produto do gene da invasão e metástase do linfoma de célula T (do inglês *T-cell lymphoma invasion and metastasis gene*), indicando a importância da sua proteína codificada para esses passos tardios da progressão tumoral. A função de Tiam1 parece ser estimulada por sua associação com Ras ativa ligada a GTP, e também por sua ligação com PIP₃. Ativando proteínas Rac, Tiam1 GEF encoraja a polimerização localizada da actina na margem anterior das células migratórias, produzindo, assim, a lamelipódia, que é tão crítica para a locomoção celular (veja as Figuras 14.36C e 14.38C).

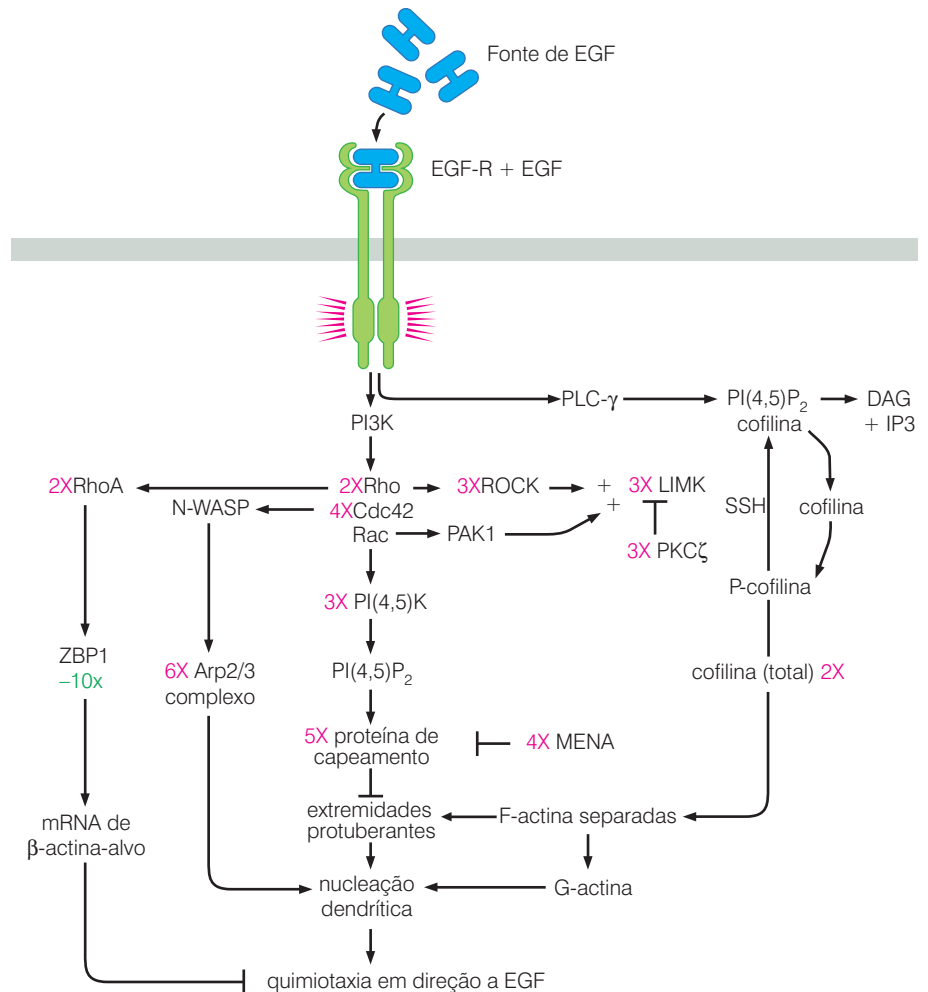
Outras proteínas tipo Rho que são ativadas por GEFs-Rho são responsáveis por um número distinto de componentes do programa de mobilidade da célula. Por exemplo, proteínas Rho, como RhoA e RhoB, agindo em conjunto com proteínas Rac, promovem o estabelecimento de novos pontos de adesão entre a margem anterior da célula e a matriz extracelular. O inverso também é verdadeiro: a formação de novos focos de adesão (veja a Figura 14.38B) também encoraja a ativação de Rac, sugerindo a operação de algum tipo de “retrolimentação positiva”, auto-sustentável, que assegura a continuidade do movimento adiante. Proteínas Rac e Cdc42 também parecem hábeis em induzir a expressão de certas proteases secretadas, notavelmente a matriz de metaloproteínases descrita na seção anterior. Fazendo isso, elas podem coordenar o remodelamento localizado da matriz extracelular com extensão de lamelipódia na margem anterior da célula móvel.

A contração do corpo celular (que ajuda a empurrar o revestimento da margem celular na direção da margem anterior) é igualmente importante para o movimento direcionado da célula. Essa contração é também governada, em grande parte, por membros da subfamília Rho de proteínas. Encorajando a formação de um feixe de actina no citoplasma, as proteínas Rho são capazes de criar estruturas conhecidas como “fibras de estresse” (veja a Figura 14.35 e 14.38B), contribuindo para a regulação da contratilidade do citoplasma. Cerca de 22 fatores distintos de troca do nucleotídeo guanina (GEFs) têm sido descobertos para a subfamília Rho de proteínas. Muito dessa complexidade é provavelmente atribuído à necessidade de ativar certas proteínas Rho em microdomínios do citoplasma em resposta a sinais fisiológicos celulares específicos. Diferentemente determinada, a ativação dessas proteínas Rho necessita ser muito coordenada no tempo e no espaço para que o programa de mobilidade celular seja executado apropriadamente.

Cdc42, que representa a terceira subfamília de proteínas semelhantes a Rho, tem sua função especializada própria: ela é capaz de induzir a extensão do filopódia tipo-dedo (veja as Figuras 14.37 e 14.38D). Não está clara a forma precisa como as filopódias contribuem para a mobilidade celular. Além disso, Cdc42 ativada é capaz de estimular mobilidade celular generalizada, independentemente dos efeitos específicos nos filopódias.

Para complicar ainda mais, as ações de Rho, Rac e Cdc42 são distintas em diferentes tipos celulares. Por exemplo, em células epiteliais normais (mais do que nos fibroblastos discutidos anteriormente), proteínas da subfamília Rac e Rho são responsáveis pela manutenção das

Figura 14.39 Esquema mediando mobilidade celular induzida por EGF. Muitas das proteínas de sinais de transdução que permanecem *downstream* ao receptor de EGF e são responsáveis pela mediação da mobilidade celular induzida por EGF estão indicadas aqui. As relativas proporções dessas proteínas alteram células de câncer de mama que adquirem mobilidade e invasividade: a extensão da superexpressão de certas proteínas em células de câncer é indicada por números em *rosa*, enquanto a extensão de expressão reduzida é indicada por números em *verde*. Algumas proteínas, como cofilinas, separam as fibras de actina já existentes em certas regiões da célula, enquanto proteínas de capeamento previnem a extensão de fibras existentes. As ações de algumas dessas proteínas de sinalização são discutidas na Seção 6.6. (De W. Wang, S. Goswami, E. Sahai et al., *Trends Cell Biol.* 15: 138-145, 2005.)



junções aderentes entre células dependentes de E-caderina; como foi visto, essas junções são vitais para a preservação da lâmina de células epiteliais, e conseqüentemente imobilizando essas células participantes. Em células não-móveis, Tiam1 (fator de troca de Rac) é encontrado nessas junções aderentes, enquanto em células migratórias, Tiam1 localiza-se nas lameli-pódias e está relacionada com desordens de membrana.

A tarefa de integrar essas observações tão diferentes em um esquema simples apenas começou. Uma tentativa inicial é vista na Figura 14.39, que descreve parte do circuito da sinalização que permanece *downstream* do receptor EGF e é responsável pela coordenação do movimento celular estimulado por EGF. Virtualmente, todos os subcircuitos descritos nesse mesmo esquema provavelmente participam da organização da mobilidade estimulada por outros fatores de crescimento mitogênicos, como HGF e PDGF.

A relevância das proteínas da família Rho em metástase de câncer tem sido destacada por pesquisas de genes que são expressos em células metastáticas e muito menos em células não-metastáticas. Em um conjunto de experimentos, fortes variantes metastáticas de linhagens de células tumorais de melanoma de camundongo e humanos foram selecionadas, e o padrão de expressão gênica das linhagens celulares foi então comparado com células fracamente metastáticas. Proeminente entre os genes cuja expressão foi elevada em variantes metastáticas, foi o gene que codifica a proteína RhoC (da subfamília Rho). Além disso, a introdução de um vetor que expressa RhoC em células de melanoma pou-

co metastáticas tornou-as altamente metastáticas, enquanto a expressão ectópica de uma forma de interferência dominante de RhoC reduziu a força de células geralmente metastáticas (Figura 14.40). RhoC também foi encontrada sendo bastante expressa em células inflamatórias de câncer de mama, que em geral são muito agressivas.

A expressão forçada do gene RhoA em células de hepatoma de rato, normalmente não-invasivas, causa a exibição de um comportamento invasivo; ele também aumenta o comportamento metastático de células NIH 3T3 transformadas e de células de melanoma pouco metastáticas. Uma comparação do padrão de expressão do gene (i. e., invasivo e metastático) com variantes não-agressivas de linhagens celulares humanas de carcinoma de bexiga T24 indica que um dos genes, cuja expressão é mais diminuída em células agressivas, especifica a proteína RhoGDI-2, um conhecido inibidor de ativação de Rho.

Ainda não sabemos quão precisamente os estudos de mobilidade de células de câncer em cultura refletem o comportamento dessas células em tecidos vivos. Apesar de tudo, parece provável que tanto o comportamento *in vitro* quanto o *in vivo* seja coordenado por uma rede de proteínas tipo Rho que modulam forma celular, adesão e proteólise localizadas próximo à matriz extracelular. Essas funções celulares são claramente críticas para o comportamento invasivo e metastático de células malignas. Talvez o maior transtorno seja uma potencial complexidade dessa maquinaria de sinalização: análises da sequência do genoma humano indicam que cerca de 20 proteínas da família Rho são reguladas por ao menos 80 diferentes fatores de troca do nucleotídeo guanina (i. e., GEFs-Rho).

14.8 Células em metástase podem usar vasos linfáticos para sair do tumor primário

Células móveis, após tornarem-se invasivas, entram nos vasos do sangue ou sistema linfático – processo de intravasação –, se dispersam e, se sobreviverem aos rigores da viagem, finalmente fixam-se em um tecido e permanecem a alguma distância do tumor primário.

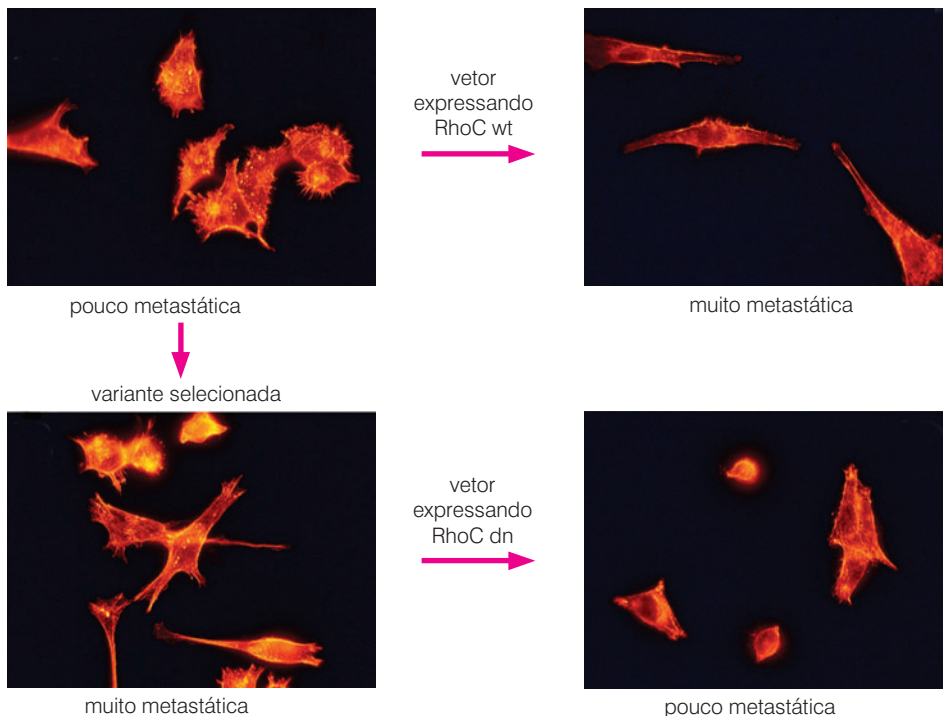


Figura 14.40 Influência de RhoC na metástase. Variações da linhagem celular humana de melanoma foram derivadas tanto de fracas como de potentes metástases; a última teve mais mobilidade e invasividade *in vitro*. A habilidade metastática foi medida pela injeção de células tumorais na veia da cauda de camundongos e pela contagem de metástases resultantes em pulmão; esse ensaio mede alguns passos da cascata invasão-metástase (p. ex., extravasação), mas não todos eles. Células pouco metastáticas (esquerda, acima) mostraram uma morfologia epitelial, enquanto células muito metastáticas (esquerda, abaixo) pareceram fibroblásticas. A introdução de um vetor retroviral expressando altos níveis de RhoC tipo selvagem (wt) em células pouco metastáticas produziu células (direita, acima) que mostraram uma aparência alongada, fibroblástica e foram muito metastáticas. Inversamente, a introdução de uma proteína RhoC dominante-negativa (dn) em células potentemente metastáticas produziu células que foram mais epiteliais em aparência (direita, abaixo) e perderam quase toda sua habilidade metastática, bem como sua mobilidade e invasividade *in vitro*. (De E.A. Clark, T.R. Golub, E.S. Lander e R.O. Hynes. *Nature* 406: 532-535, 2000.)

A viagem pela circulação sangüínea é freqüentemente chamada espalhamento **hematógeno** e depende do sucesso prévio da angiogênese pelo tumor. Isso enfatiza o fato de a angiogênese beneficiar células de câncer em dois caminhos distintos. Por um lado, ela apóia a atividade metabólica requerida por essas células para sobreviverem e proliferarem. Por outro lado, proporciona às células tumorais um acesso direto para a dispersão pelo corpo.

A discussão estendida do espalhamento hematológico na Seção 14.1 reflete o importante papel da circulação sangüínea na disseminação da metástase. A contribuição dos vasos linfáticos para a dispersão das células de câncer é, entretanto, menos óbvia. Quase todos os tecidos do corpo carregam redes de vasos linfáticos que são responsáveis pela contínua drenagem do fluido **intersticial** acumulado no espaço entre as células. Muitos dos vasos convergem em um vaso abdominal principal que esvazia sua linfa na veia subclava esquerda perto do coração e, portanto, na circulação geral. Como consequência, células de câncer presentes nos vasos linfáticos poderiam ocasionalmente entrar por essa conexão cruzada na circulação geral.

Células tumorais e companheiros estromais recrutados podem secretar VEGF-C, que dirige linfangiogênese – a formação de novos vasos linfáticos (Seção 13.6). Além disso, tumores experimentais forçados a secretar aumentados níveis de VEGF-C originariam muitas células metastáticas na vizinhança dos nódulos linfáticos “drenantes” – os linfonodos associados aos ductos linfáticos que drenam os tecidos nos quais o tumor permanece (Figura 14.41A). Entretanto, análises histológicas detalhadas de tumores crescendo espontaneamente indicam que vasos linfáticos funcionais são raramente encontrados por toda a massa tumoral. Ao contrário, eles estão amplamente presentes na zona periférica de tumores sólidos. Aqueles poucos vasos linfáticos descobertos na região central de massas tumorais são normalmente colapsados (veja a Figura 13.36). Como discutido no capítulo anterior, parece que a expansão da massa das células de câncer dentro do tumor pressiona esses vasos; como os ductos linfáticos têm pequena pressão hidrostática interna, não resistem a essas forças e colapsam.

A ausência de vasos linfáticos funcionais dentro de massas tumorais deve influenciar as vias usadas por células de câncer em metástase que deixam o tumor primário. Sem o acesso direto aos ductos linfáticos, muitas células de câncer móveis são forçadas a usar os capilares funcionais muitos mais numerosos, que estão presentes na massa tumoral, como suas rotas de escape. Apesar de tais acessos limitados, algumas células de câncer têm sucesso em entrar no sistema linfático. No caso específico de carcinoma mamário, algumas células em metástase entram nos vasos linfáticos que diretamente drenam a glândula mamária e coletam dentro das vizinhanças dos nódulos linfáticos (veja a Figura 14.41A). Essas células de carcinoma vagantes são prontamente detectáveis nos ductos e nódulos linfáticos, porque sua aparência difere muito das células linfóides que as cercam (Figura 14.41C) e elas expressam proteínas epiteliais, como citoqueratinas, ausentes nos tecidos linfáticos (Figura 14.41D). Análises histológicas dos linfonodos drenantes são rotineiramente usadas para determinar se um câncer de mama primário começou a despachar células metastáticas pioneiras para locais distantes no corpo (Barra lateral 14.6).

Os nódulos linfáticos drenantes do tumor primário poderiam funcionar bem como áreas de preparação. Então, uma vez que as células de câncer se multiplicam e formam pequenas metástases dentro desses nódulos, elas podem se dispersar mais tarde, despachando pioneiros metastáticos para lugares mais distantes no corpo. De fato, por muito tempo no século XX, cirurgiões acreditaram que linfonodos drenantes de um tecido funcionavam como filtros e que, uma vez que esses nódulos eram preenchidos por células metastáticas, estas eram derramadas em outros vasos linfáticos, com o objetivo de disseminarem largamente através do corpo.

A idéia alternativa é a de que nódulos linfáticos drenantes representam o “beco sem saída” para células de câncer disseminadas, isto é, aquelas células de câncer que proliferam dentro

desses nódulos raramente se locomovem para locais mais distantes do corpo. Além disso, estudos em pacientes com câncer de mama, cabeça e pescoço, gástrico e carcinoma colorectal indicaram que a remoção cirúrgica de linfonodos drenantes não tem efeito na sobrevivência dos pacientes. Tais observações sugerem que metástases através da linfa e através do sangue operam em paralelo e que células de câncer que chegam nos nódulos linfáticos normalmente não vão adiante. Como consequência, nódulos linfáticos representam “**marcadores substitutos**” de metástases por proporcionarem dados para diagnóstico e prognóstico úteis sem estarem diretamente envolvidos no processo que leva à disseminação difundida de células de câncer e doença metastática.

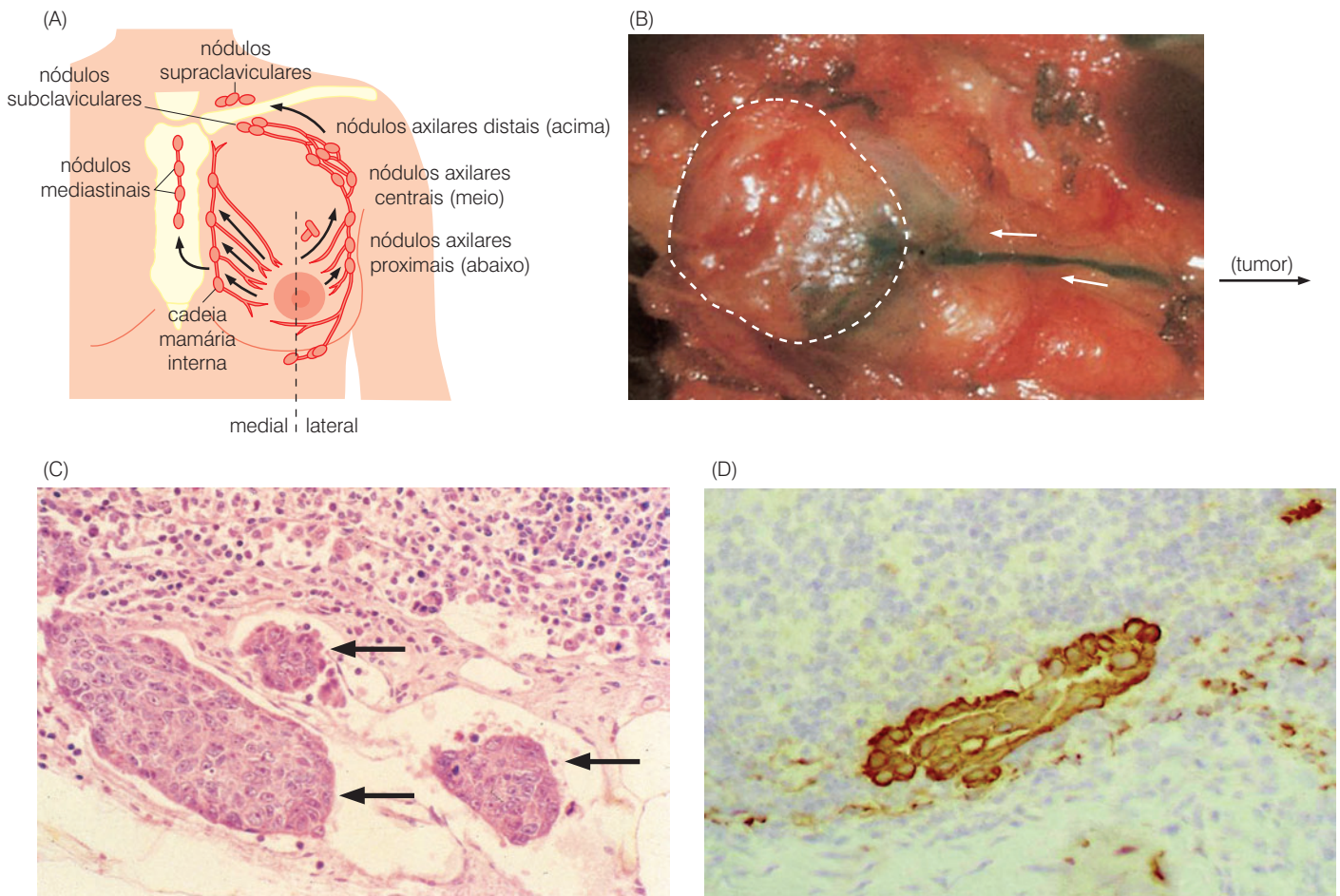


Figura 14.41 Linfonodos drenantes da glândula mamária (A) Os ductos linfáticos (*vermelho*) e os linfonodos drenantes de mama (*ductos inchados*) são os locais de disseminação inicial, sendo carregados pelo fluxo da linfa (*setas*), deixando vários setores da mama. Carcinomas chegando nesses diferentes setores tendem a depositar células metastáticas em diferentes conjuntos de linfonodos drenantes. A descoberta de células de carcinoma nesses linfonodos, os quais são observados em mais de 30% de carcinomas de mama humanos no diagnóstico inicial, sugere a possibilidade de depósito de células metastáticas em locais mais distantes do corpo, particularmente se grande número de nódulos drenantes são encontrados por carregar células de câncer de mama. (B) Os linfonodos que servem como linfonodos-sentinelas de um tumor podem geralmente ser identificados entre todos os linfonodos drenantes da mama (painel A) pela injeção de um corante azul no tumor (fora do campo fotográfico, à direita) seguindo o

rastros do corante via ductos linfáticos (*setas*) do nódulo drenante (*linha pontilhada, esquerda*). (C) A coloração com hematoxilina-eosina (H&E) de uma secção de um linfonodo *axilar* revela que três micrometástases chegando de um tumor primário de mama (*setas*) cresceram no espaço entre a cápsula ao redor do nódulo (*não-visto, abaixo*) e a massa de linfócitos dentro do nódulo (*pequenas células, núcleo escuro, acima*), deslocando-o para cima. (D) Imuno-histoquímica usando anticorpos específicos para citoqueratinas (*marrom*) revela esta pequena micrometástase no linfonodo-sentinelas. Tal procedimento é mais sensível do que a coloração H&E do painel C na detecção de pequenas micrometástases, uma vez que células mesenquimais do linfonodo não expressam citoqueratinas, as quais são produzidas por células epiteliais. (A, B e C, de A.T. Skarin, *Atlas of Diagnostic Oncology*, 3rd ed. Philadelphia: Elsevier Science Ltd., 2003; D, de J.P. Leikola, T.S. Toivonen, L.A. Krogerus et al., 104: 14-19, 2005.)

Barra lateral 14.6 Linfonodos são sentinelas que carregam informações prognósticas importantes Os linfonodos associados a ductos linfáticos que drenam vários tecidos operam como pontos de coleção para fragmentos subcelulares e células que deixam esses tecidos; além disso, células do sistema imune tornam-se ativadas em resposta a antígenos que chegam primeiro a esses nódulos. Isso explica por que nódulos drenantes associados a uma variedade de órgãos (p. ex., glândula mamária; Figura 14.41A) são rotineiramente examinados para determinar se células de câncer foram libera-

das pelos tumores primários em tais órgãos. Por exemplo, em diagnóstico inicial, cerca de um terço de pacientes com carcinoma oral, cervical, colorretal e mama têm células cancerosas em metástase nos linfonodos perto do seu tumor primário (veja a Figura 14.41C e D).

Esses linfonodos drenantes servem como “alarme”, providenciando uma advertência inicial da presença de células em metástase no corpo. Entre esses linfonodos regionais, o simples nódulo que diretamente drena o tumor primário é freqüentemente chamado “linfonodo-sentinela” (Figura 14.41B). Pacientes com baixo número de nódulos afetados com

freqüência têm apenas disseminação localizada do câncer de mama e podem nunca desenvolver doença metastática, enquanto aqueles com muitos nódulos afetados são mais prováveis de abrigar outros depósitos de células metastáticas em locais distantes do corpo. Por exemplo, em um estudo, 90% de pacientes com sobrevida longa têm um, dois ou ocasionalmente três linfonodos “positivos” no diagnóstico. De maneira inversa, pouco mais de 5% de pacientes com mais de cinco linfonodos positivos quando seu tumor primário foi removido tiveram sobrevida longa, livre de doença.

14.9 Vários fatores governam os locais nos órgãos em que células de câncer disseminadas formam metástases

As descrições, nas seções anteriores, dos mecanismos de invasão e disseminação metastática parecem explicar, ao menos superficialmente, como muitos dos passos da cascata invasão-metástase procedem. Além disso, é plausível que se observe, um dia, que estratégias de dispersão usadas por uma grande variedade de tipos celulares de câncer metastáticos evasivos sejam controladas por um conjunto comum de princípios mecânicos, tais como aqueles discutidos neste capítulo. É importante lembrar, entretanto, que nossas discussões não se aplicam ao último passo da cascata invasão-metástase-colonização.

O crescimento de micrometástases (< 2 mm de diâmetro) em macrometástases (> 2 mm de diâmetro) é claramente o passo-chave para determinar se a doença será metastática ou não. Por exemplo, 30% das mulheres diagnosticadas com carcinomas de mama primários têm milhares de micrometástases na sua medula, muitas compostas por células únicas ou pequenos grupos de células (veja, por exemplo, a Figura 14.2C). Ainda, apenas metade dessas mulheres sofrerá um relapso da doença disparado por aparentes metástases macroscópicas. Claramente, a colonização é um processo muito ineficiente, e a grande maioria das células que acabam formando pequenas micrometástases nunca conseguem se adaptar de maneira adequada ao tecido no qual chegaram, originando macrometástases.

Além disso, enquanto uma variedade de tipos de célula de câncer pode executar os primeiros passos da cascata invasão-metástase de um modo muito similar, é provável que a colonização por cada tipo celular de câncer proceda de modo muito diferente. Então, é provável que a adaptação, com sucesso, de células de câncer de mama em metástase para a medula óssea (a qual, por definição, permite que essas células colonizem a medula) envolva um conjunto completamente diferente de mudanças celulares com relação àquele requerido para a colonização da medula por células de câncer de próstata. Além disso, as mudanças requeridas para as células de câncer de mama colonizarem a medula óssea são provavelmente muito diferentes daquelas para a colonização com sucesso de cérebro e pulmão.

Muitas evidências apóiam a idéia de que células de câncer metastáticas que colonizaram um determinado órgão-alvo tornaram-se, para fazê-lo, *altamente especializadas*. A seguir, temos algumas indicações disso. (1) setenta e cinco por cento de pacientes jovens com carcinomas de tireóide papilares têm significativas metástases nos linfonodos, mas apenas 3% desenvolverão metástases distantes. Ainda, a adaptação aos linfonodos por células de carcinoma de tireóide em metástase não permite a elas colonizar outros tecidos no corpo. (2) Similarmente, tumores de duodeno maiores do que 1cm em diâmetro (contendo > 10⁹ células) têm uma alta taxa de metástases nos linfonodos, ainda que raramente tenham metástases no fígado, que é um local comum de metástases de tumores que aparecem perto do cólon. (3) Células

Barra lateral 14.7 Células de câncer precisam “aprender” a colonizar locais para metástase Implícita nessas descrições de colonização está a noção de que células neoplásicas dentro do tumor primário não ganham a habilidade de colonizar um ou outro órgão-alvo no momento em que se tornam tumorogênicas. Ao contrário, para muitos tipos de células de câncer, a habilidade de colonizar é um traço que parece ser adquirido independentemente da aquisição de tumorogenicidade. Isso faz sentido, uma vez que forças biológicas operam dentro do tumor primário selecionado para a habilidade de células variantes de proliferar em um microambiente particular e não em um microambiente distante, biologicamente não-relacionado a tecidos.

As questões não respondidas por esses argumentos são *onde* e *quando* células tumorais aprendem a colonizar um órgão-alvo parti-

cular. Alguns subclones de células dentro da massa tumoral primária poderiam, por casualidade, adquirir essa habilidade como um produto não-selecionado de forças que levam inicialmente ao seu desenvolvimento potencial tumorogênico. Mais frequentemente, entretanto, a aquisição da habilidade em colonizar provavelmente ocorre ao lado da formação final da metástase, onde grande número de micrometástases reside por extensos períodos de tempo até que células de câncer dispersas adquiram a habilidade em colonizar. Nesse caso, a seleção darwiniana favorecendo cada célula variante é clara e óbvia, uma vez que seus descendentes teriam bastante sucesso em proliferar em locais distantes, enquanto todas as outras micrometástases vizinhas nesse tecido estagnariam e, por fim, desapareceriam.

de câncer isoladas de metástases em linfonodos humanos foram encontradas, depois da injeção no sistema venoso de camundongos, crescendo preferencialmente nos linfonodos dos seus camundongos hospedeiros, ao invés de em outros possíveis locais de colonização. (4) A remoção cirúrgica de metástases isoladas de carcinoma colorretal relativamente grande, presente no fígado ou pulmão, com frequência resulta em sobrevivência livre de doença por vários anos, apesar do fato de a circulação dos pacientes com tais metástases claramente carregar um grande número de células em metástase, incluindo algumas que já possuem habilidade em colonizar um ou mais órgãos. (5) Células de melanoma de camundongo podem ser selecionadas para fazer metástase preferencialmente em pulmões, ou células de câncer de mama para fazer metástase em pulmões ou, alternativamente, em ossos. Essas observações discrepantes reforçam a idéia de que a habilidade em colonizar certos órgãos representa uma especialização adquirida (Barra lateral 14.7).

Um outro fator afeta essa dinâmica: diferentes tipos de células de câncer adquirem a habilidade em colonizar um dado tecido com maior ou menor facilidade. Então, a habilidade de células de câncer de próstata em fazer metástase para a medula parece ser muito mais facilmente adquirida do que sua habilidade em colonizar fígado ou pâncreas. Isso sugere que o programa de diferenciação de células epiteliais prostáticas normais exerce uma forte influência na habilidade de células de carcinoma derivadas para fazer metástase em órgãos específicos. Se colocássemos células de carcinoma de próstata e órgãos-alvo potenciais em um mapa representando tendências metastáticas (Figura 14.42), poderíamos indicar que células prostáticas têm um “acesso” relativamente fácil à medula óssea, implicando a necessidade de sofrer pequenas mudanças para se adaptarem a esse local. Ao contrário, elas têm um acesso mais limitado a outros órgãos, como o fígado e o pâncreas, nos quais elas raramente formam metástases macroscópicas.

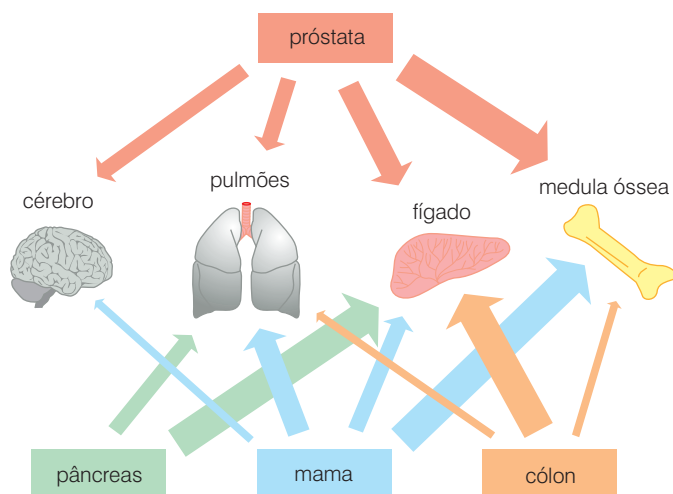


Figura 14.42 Tumores primários e seus tropismos metastáticos Neste diagrama, a relativa largura de cada seta indica a relativa proporção de metástases aparentes clinicamente que são geradas por um adenocarcinoma primário. Quatro tipos são indicados aqui: próstata, mama, pâncreas e côlon. Em alguns casos, a tendência do tumor a semear metástase em um ou outro tumor reflete a habilidade das células de câncer do tumor primário em adaptar (e então colonizar) o microambiente de tecidos distantes; isso provavelmente explicaria as fortes tendências dos cânceres de próstata e mama a gerar metástases na medula óssea. Em outros casos, o *layout* da circulação pode influenciar muito o local da metástase. Por exemplo, a alta proporção de metástase em fígado derivando de câncer de côlon primário pode refletir a drenagem via veia porta do sangue do côlon diretamente para o fígado (veja a Figura 14.44).



Figura 14.43 Stephen Paget O médico britânico Stephen Paget foi o primeiro a enunciar a hipótese “semente e solo”, a qual declara que a habilidade de disseminação de células cancerosas em iniciar uma metástase com sucesso depende de se o tecido distante oferece um ambiente hospitaleiro para sobrevivência e proliferação. (De I.J. Fidler, *Nat. Rev. Cancer* 3: 453-458, 2003.)

Essa predileção para formar macrometástase em um outro ou órgão foi notada em meados de 1889, pelo patologista britânico Stephen Paget (Figura 14.43). Ele propôs a hipótese da “semente e solo”, na qual ele fez uma analogia da sementeira de células de câncer com a dispersão de sementes de plantas. Após o estudo do curso clínico de 735 pacientes de câncer de mama, Paget concluiu que o padrão da formação de metástases nessas pacientes não poderia ser explicado por dispersão aleatória através do corpo nem por padrões de dispersão da mama através da circulação geral. Ele então propôs que células de câncer em metástase (sementes) encontrariam um local compatível apenas em certos tecidos, especialmente hospitaleiros (o solo). Segundo Paget, “uma planta dá sementes, e tais sementes são carregadas em todas as direções mas elas podem apenas viver e crescer se encontrarem um solo fértil”. Essa habilidade em formar metástases macroscópicas em alguns locais, mas não em outros, tem sido destacada por certos procedimentos clínicos.

O modelo da semente e solo estabelece explicitamente que células de câncer disseminadas são dispersadas “em todas as direções”, ou seja, por todo o corpo. Essa afirmação traz à tona uma outra idéia: a razão pela qual muitos tipos de células de câncer formam metástases em um órgão-alvo específico não é atribuída a sua migração direta ou estabelecimento nesse órgão. Ao contrário, elas são dispersadas aleatoriamente, e apenas aquelas células de câncer que conseguem chegar em um tecido hospitaleiro razoável obtêm sucesso em sobreviver, formar micrometástases e, ocasionalmente, tendo aprendido como colonizar, formar metástases macroscópicas. Células essencialmente idênticas disseminando poderiam chegar, com uma mesma alta frequência, em outros órgãos, nos quais elas pereceriam imediatamente ou sobreviveriam como micrometástases, sem ter sucesso em colonizar esses locais.

A hipótese da semente e solo não pode, entretanto, explicar o padrão metastático de *todos* os tipos de cânceres humanos (veja a Barra lateral 14.8). Ao contrário, em certos casos, a predileção em fazer metástase em certos órgãos é provavelmente ditada pelo desenho dos vasos que conectam o local do tumor primário e o local da metástase. Por exemplo, a forte tendência de células de carcinoma de cólon em fazer metástase para o fígado poderia simplesmente refletir o fato de elas deixarem o estômago via veia porta (que drena o trato gastrointestinal inferior e o baço) e, após uma breve viagem, quase inevitavelmente tornarem-se alojadas nos capilares do fígado que são alimentados por essa veia (Figura 14.44). Mesmo se células de câncer de cólon em metástase colonizam o fígado com uma eficiência extremamente baixa, o número absoluto de células de câncer presas no fígado garante que, com a passagem do tempo, um número substancial de metástases apareceria nesse órgão-alvo.

A mesma lógica poderia explicar por que células de câncer de mama frequentemente formam metástases em pulmões. Como no caso de células de carcinoma colorretal, células de carcinoma mamário dispersas poderiam não encontrar os pulmões como um ambiente especialmente hospitaleiro, e células de câncer individuais teriam uma baixa probabilidade de colonizar pulmões com sucesso. Apesar disso, algumas metástases ao final se formarão lá, simplesmente porque tantas dessas células permanecem fisicamente ligadas a esse tecido (veja a Figura 14.44). Essa lógica sugere que, em geral, a frequência de metástases para um órgão é governada por dois parâmetros: a frequência em que células que fazem metástase são fisicamente ligadas em um órgão, e a facilidade com a qual elas podem se adaptar ao microambiente daquele órgão, colonizando-o então.

Há também indicações de que tecidos que não são normalmente locais hospedeiros para colonização podem tornar-se por meio de processos patológicos específicos, como ferimentos localizados. Isso sugere que áreas de inflamação crônica no corpo de um paciente com câncer podem ocasionalmente tornar-se ambientes favoráveis para as células cancerígenas que sofrem metástases, simplesmente porque oferecem um espectro de sinais mitogênicos e tróficos, como discutido no Capítulo 13.

Ainda assim, outros mecanismos têm sido propostos para explicar o **tropismo** de tecidos de células que sofrem metástase. Por exemplo, órgãos-alvo podem liberar mensagens químicas específicas – os quimioatrativos, às vezes denominados quimiocinas – que podem ativamente recrutar células cancerígenas dispersas para entrar nestes órgãos a partir da circulação. Tal

Barra lateral 14.8 Metástases contralaterais são relativamente raras Possivelmente a grande dificuldade da hipótese de semente e solo vem da falha em explicar a raridade de metástases contralaterais. Por exemplo, células de câncer disseminadas do tumor primário a partir de um tumor primário em uma mama deveriam intuir que a mama **contralateral** (i. e., oposta) fornece o ambiente mais hospitaleiro para colonização. De fato, apenas 2% dos cânceres de mama resultam em metástase contralateral, comparável à frequência de tumores na mama que aparecem como metástase de tumores primários localizados fora da mama. De maneira similar, cânceres de rins primários raramente fazem metástase em rins contralaterais. Esses comportamentos são claramente incompatíveis com a hipótese da semente e solo e ainda requerem explicação.

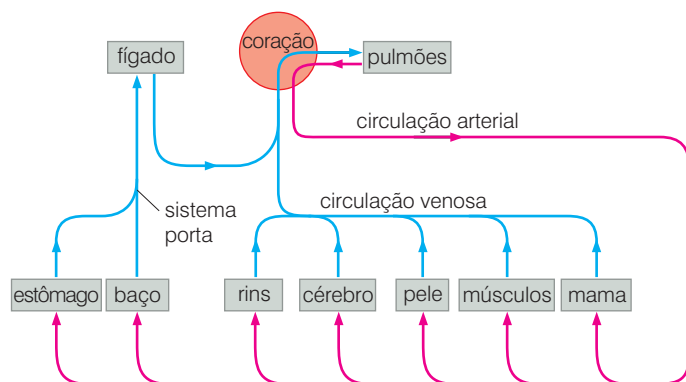


Figura 14.44 Circulação porta e metástase no fígado Enquanto o sistema venoso de muitos tecidos drena para o lado direito do coração e então para os capilares dos pulmões, as veias drenantes do baço e estômago são organizadas diferentemente; elas envaziam-se diretamente no fígado via circulação porta. (Depois de passar através do fígado, o sangue venoso é então remetido de volta para o coração.) Como consequência, um vasto número de células de carcinoma colorretal em metástase são presas em capilares do fígado segundos depois de deixar o cólon. (Adaptada de I.C. MacDonald, G.C. Groom e A.F. Chambers, *BioEssays* 24: 885-893, 2002.)

quimioatração claramente opera para garantir o estabelecimento de uma variedade de células imunológicas circulantes para tecidos específicos como parte das operações normais do sistema imune. Em um estudo, quando células de melanoma de camundongo B16 foram forçadas a expressar o receptor da quimiocina CXCR4, suas metástases para o pulmão aumentaram em um fator de 10. Porém, quando um vetor expressando o receptor CXCR7 foi introduzido nessas células de melanoma, elas então mostraram um substancial aumento de metástases para os nódulos linfáticos, apropriando-se, assim, de um mecanismo normalmente usado pelos linfócitos para se dirigir a esses nódulos. (Na verdade, como esses receptores ativados por quimiocinas freqüentemente oferecem sinais mitogênicos e de sobrevivência às células cancerígenas, é difícil saber se esses receptores quando ativados por seus ligantes induzem células que formam metástases a migrar para um tecido ou simplesmente encorajam a sobrevivência e proliferação dessas células após elas terem chegado no tecido.)

De acordo com outro possível mecanismo de tropismo metastático, os capilares que formam as *camas vasculares* (i. e., a rede de vasos sangüíneos) em vários tecidos expressam moléculas tecido-específicas em suas superfícies luminais. Essas moléculas podem oferecer sítios de acoplagem específicos para células cancerígenas que expressam certas moléculas de adesão, como integrinas, em suas superfícies. Esse modelo é algumas vezes denominado de teoria do “**código postal vascular**”, porque implica que as superfícies luminais de vasos em diferentes tecidos carregam, na forma química, endereços específicos de estabelecimento, muito similares àqueles usados por um sistema postal. Esse modelo falha ao não levar em conta o fato de que células cancerígenas são freqüentemente rodeadas por nuvens de plaquetas capazes de bloquear a associação direta entre a célula cancerígena e as superfícies luminais de células endoteliais.

Um estudo detalhado do comportamento de cânceres humanos que sofreram metástases calculou que 66% de metástases poderiam ser explicadas simplesmente pelos padrões de fluxo sangüíneo entre o tumor primário e os locais de metástases observados. Em 20% dos casos, os microambientes especializados dos tecidos-alvo (em vez de padrões de fluxos sangüíneos) aparentemente forneceram a explicação da tendência de certos tipos de câncer a formar metástases macroscópicas nesses tecidos. E finalmente, em 14% dos casos, interações negativas (nas quais tecidos pareciam ativamente repelir células cancerígenas vagantes) parecem explicar números abaixo do esperado de metástases previstas pelos padrões de fluxo sangüíneo.

Para resumir, essas diversas observações sugerem que células que formam metástases dispersam para muitos órgãos no corpo e que sua dispersão é afetada pela conformação da vascularização. Uma vez chegando a esses vários locais, as células cancerígenas irão em geral sobreviver e finalmente colonizarão somente aqueles tecidos que fornecerem a elas quimiocinas específicas, fatores tróficos e mitógenos. Algumas vezes, entretanto, essas células podem ser bem-sucedidas em formar metástases macroscópicas em órgãos relativamente inóspitos, somente porque o direcionamento da circulação sangüínea introduz um grande número destas células em tais locais.

14.10 Metástase para o osso requer subversão de osteoblastos e osteoclastos

O desenvolvimento de metástases em ossos representa um exemplo no qual entende-se, com algum detalhe, os mecanismos bioquímicos e biológicos que permitem que células de câncer em metástase desenvolvam-se em um microambiente tecido específico. Esse fato justifica uma discussão detalhada de metástase **osteotrópica**. Além disso, e como mencionado repetidas vezes, muitos dos tipos mais comuns de câncer que ocorrem no mundo ocidental – carcinomas de pulmão, mama e próstata – mostram uma forte tendência a fazer metástase no osso. De fato, pacientes com câncer de mama e próstata avançados desenvolvem quase sempre metástase de osso. E, em pacientes que sucumbem desses cânceres, a maior parte das células tumorais em seus corpos no momento da morte é geralmente encontrada entre metástases espalhadas nos seus ossos.

Em geral, pensa-se no osso como sendo um tecido estático, o qual, uma vez formado, retém sua estrutura através da vida. A verdade é muito mais interessante. Em mamíferos, cerca de 10% da massa de ossos do esqueleto é trocada a cada ano, resultando em uma troca essencialmente completa no curso de uma década. Esse contínuo remodelamento permite aos ossos responder ao estresse mecânico por reforço compensatório dessas regiões estressadas. Por exemplo, os ossos das pernas são continuamente remodelados em resposta a sinais de suporte de peso que diferentes porções de cada osso da perna recebe.

A reciclagem do osso é executada pelos **osteoclastos**, que quebram ossos mineralizados, e pelos **osteoblastos**, que os reconstróem. Os osteoclastos funcionam primeiro **desmineralizando** o osso (dissolvendo seus cristais de fosfato de cálcio) e, em seguida, degradando a matriz extracelular então exposta, que previamente formou a rede orgânica para os cristais de fosfato de cálcio (Figura 14.45). Os osteoblastos rapidamente fazem a reconstrução, a qual envolve a ligação de nova ECM e a deposição de cristais de fosfato de cálcio na matriz intersticial. Como pode ser deduzido dessa descrição, os dois tipos celulares em geral trabalham estreitamente coordenados.

Muitos tipos de células de câncer em metástase são, por si próprias, incapazes de remodelar a estrutura óssea. Ao contrário, elas manipulam e tiram partido desses dois tipos de células presentes no osso com o objetivo de modificar sua forma. Então, células de câncer de mama ativam osteoclastos, resultando em metástase **osteolítica** – literalmente, metástase que dissolve o osso. Células de câncer de próstata tendem, por outro lado, a ativar osteoblastos, produzindo lesões **osteoblásticas**, nas quais ossos mineralizados são realmente acumulados nas vizinhanças das metástases (Figura 14.46).

De fato, esses dois comportamentos representam os extremos de um contínuo, uma vez que ambos os tipos de cânceres ativam osteoblastos e osteoclastos em uma maior ou menor extensão. Por exemplo, enquanto metástases osteolíticas predominam em pacientes com câncer de mama avançado, um quarto dessas mulheres têm claramente lesões osteoblásticas definidas em seus ossos. De maneira similar, carcinomas de próstata também geram ocasionalmente metástases osteolíticas dispersadas entre muitos crescimentos osteoblásticos espalhados por esses tumores. Uma exceção a essa regra de mistura de ambos os tipos de metástases de ossos é dada por células de mieloma (tumor de célula B, linhagem secretora de anticorpos), que cria exclusivamente lesões osteolíticas no osso.

A estreita coordenação entre osteoblastos e osteoclastos é mediada, ao menos em parte, pela mudança dos sinais de fatores de crescimento. Um importante indutor de diferenciação de osteoclasto é o ligante RANK (receptor ativador de NF- κ B), ou simplesmente RANKL. RANKL é produzido e exibido na superfície de osteoblastos. Quando um precursor de osteoclasto exibe o receptor RANK, entra em contato com um osteoblasto e suas moléculas RANKL de superfície celular; isso resulta na ativação de receptores RANK do precursor de osteoclasto e sua maturação em osteoclastos funcionais (Figura 14.47). Ao mesmo tempo, osteoblastos produzem um receptor solúvel, chamado osteoprotegerina (OPG), que pode

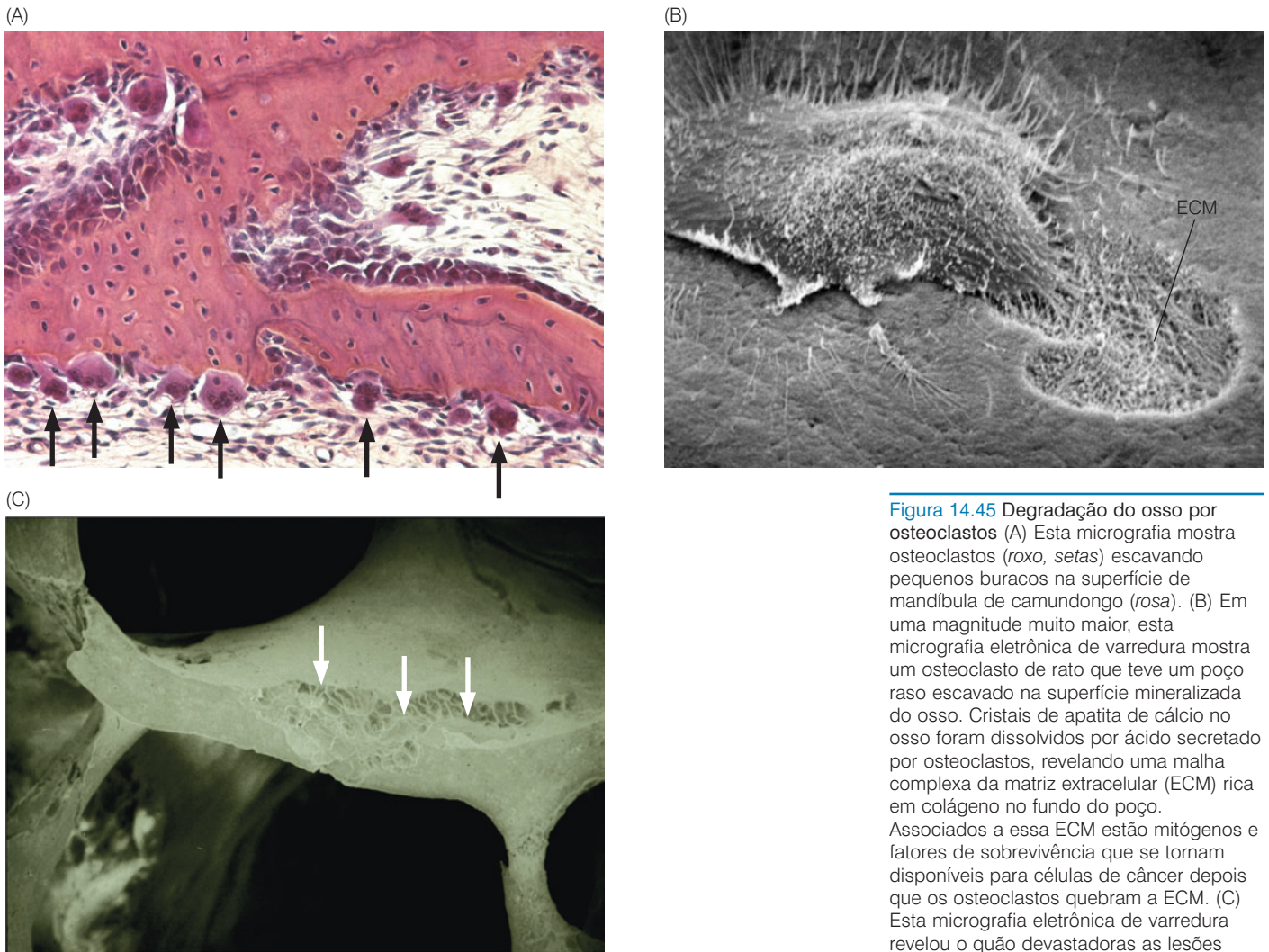


Figura 14.45 Degradação do osso por osteoclastos (A) Esta micrografia mostra osteoclastos (roxo, setas) escavando pequenos buracos na superfície de mandíbula de camundongo (rosa). (B) Em uma magnitude muito maior, esta micrografia eletrônica de varredura mostra um osteoclasto de rato que teve um poço raso escavado na superfície mineralizada do osso. Cristais de apatita de cálcio no osso foram dissolvidos por ácido secretado por osteoclastos, revelando uma malha complexa da matriz extracelular (ECM) rica em colágeno no fundo do poço. Associados a essa ECM estão mitógenos e fatores de sobrevivência que se tornam disponíveis para células de câncer depois que os osteoclastos quebram a ECM. (C) Esta micrografia eletrônica de varredura revelou o quão devastadoras as lesões osteolíticas (setas) podem ser em termos de comprometimento para a estrutura do osso em um paciente com lesões osteolíticas metastáticas. (A e B, de T.R. Arnett e D.W. Dempster, *Endocrinol.* 119: 199-124, 1986; C, cortesia de G.R. Mundy.)

ligar RANKL e emboscá-lo antes que ocorra a ativação do receptor RANK na superfície de precursores de osteoclastos. O resultado é o bloqueio da sinalização de RANKL-RANK e a inibição da maturação dos osteoclastos. Ainda, o balanço entre sinais RANKL (estimuladores) e OPG (inibidores) determina o estado de ativação dos osteoclastos.

A interação dinâmica de osteoblastos e osteoclastos providencia um embasamento para as ações de células de câncer que formam metástases em ossos. Suas atrações para os ossos derivam finalmente da matriz extracelular de colágeno (ECM) não-mineralizada que forma a rede orgânica na qual os cristais de fosfato de cálcio são depositados (veja a Figura 14.45B). ECM de osso é uma fonte não usual rica em fatores mitogênicos e tróficos que permitem que muitos tipos de células de carcinoma se desenvolvam. Conseqüentemente, provocando a desmineralização do osso, células de câncer ganham acesso à fonte de fatores seqüestrados na ECM do osso, usando-os para sua própria proliferação e sobrevivência.

Células de câncer em metástase chegam ao osso através dos vasos que alimentam a medula. Uma vez lá, elas aderem a células estromais especializadas que cobrem as superfícies dos ossos na face da medula. Células de câncer de mama em metástase, em particular, ao chegarem ao osso, reverterem o comportamento característico de seus precursores normais (células epiteliais mamárias, ou MECs). Durante a lactação, quando produzem leite, MECs formam pequenos

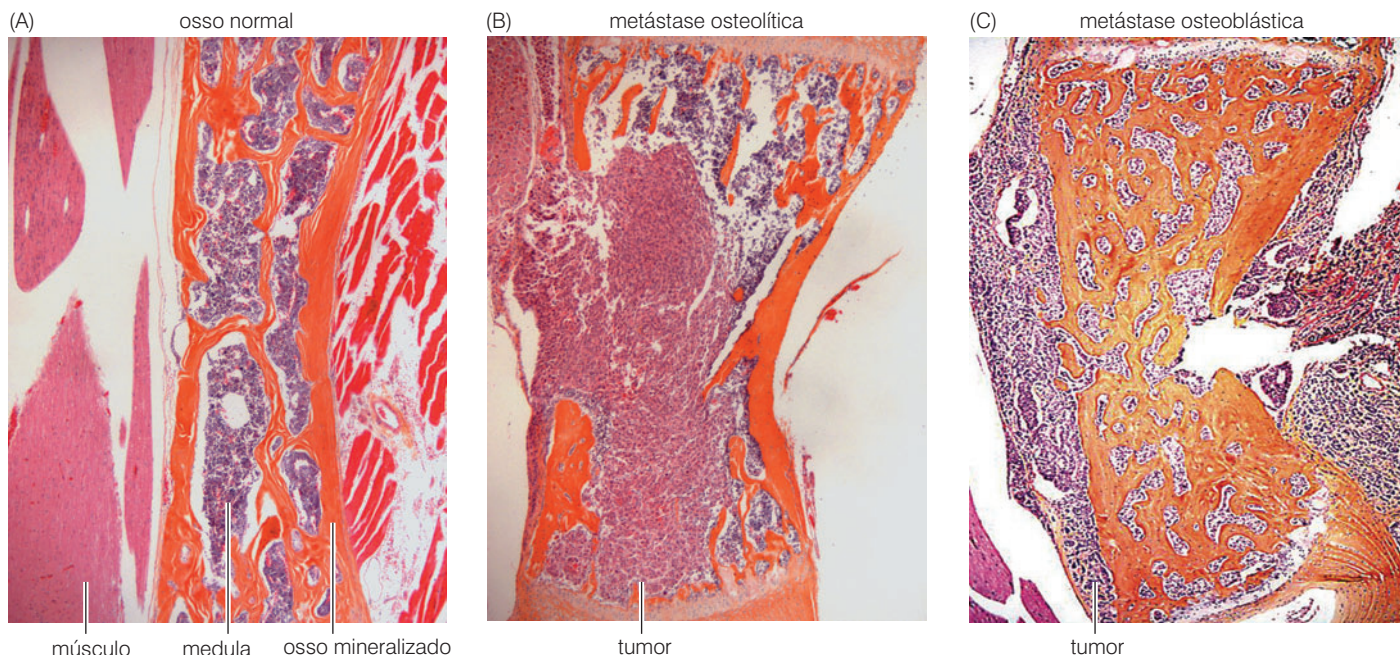


Figura 14.46 Metástase osteolítica e

osteoblástica. Estas micrografias apresentam seções de vértebra e fêmur nas quais o osso mineralizado (*laranja*), o músculo ao redor (*vermelho brilhante*) e medula óssea (*roxo-escuro*) são claramente delineados. (A) Esta vértebra do camundongo controle injetada apenas com tampão parece ser composta por abrangente medula com faixas de osso mineralizado continuadas através do osso. (B) Em um camundongo carregando uma linhagem celular de câncer de mama humano (MDA-MB-231) que cria lesões osteolíticas, muito do osso mineralizado é perdido, e a medula é deslocada por células tumorais (*vermelho-escuro*). (C) Em um camundongo carregando uma linhagem celular de câncer de mama humano (ZR-75-1) que cria lesões osteoblásticas, muito do espaço da medula é agora preenchido com osso mineralizado (*laranja*) com massa de tumor evidente para esquerda e direita. (De J.J. Yin, K.S.Mohammad, S.M.Kakonen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 10954-10959, 2003.)

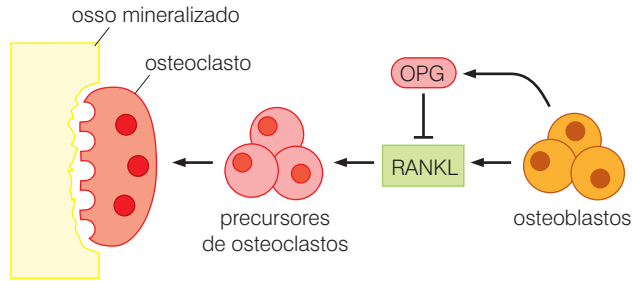
sacos (*alvéolos*) da glândula mamária, liberando o peptídeo relacionado ao hormônio paratireoidal (PTHrP). PTHrP então viaja através da circulação dos ossos, na qual dispara uma cadeia de eventos que encoraja a dissolução de minerais do osso por osteoclastos. Isso resulta na mobilização de íons de cálcio, que viajam pela circulação da glândula mamária, em que são incorporados no leite por MECs.

Esse mecanismo normal de mobilização do cálcio é subvertido por células de câncer de mama em metástases que se estabelecem em ossos (Figura 14.48). Tendo se ligado às células do estroma que cobrem a superfície mineralizada do osso, células de câncer de mama voltam ao hábito de MECs normais, liberando PTHrP. PTHrP, por sua vez, impinge diretamente seus receptores exibidos por osteoblastos, causando a liberação, por estas células, de RANKL. RANKL então induz a diferenciação de precursores de osteoclastos em osteoclastos ativos. Osteoclastos ativados degradam osso mineralizado, conseqüentemente liberando um suprimento rico em fatores de crescimento ligados à matriz extracelular do osso.

Os fatores de crescimento liberados da ECM do osso, incluindo PDGF, proteínas morfogenéticas do osso (BMPs), fatores de crescimento fibroblásticos (FGFs), fator de crescimento 1 tipo insulina (IGF-1) e TGF- β , alimentando o crescimento adicional de células de câncer de mama, induzindo-as a secretar mais PTHrP. Esse PTHrP produz mais osteólise pelos osteoclastos, liderando um sistema de sinalização de autoperpetuação que tem sido chamado de “ciclo vicioso” (veja a Figura 14.48), no qual TGF- β também desempenha um papel importante (Barra lateral 14.9).

Esse ciclo sugere possíveis pontos de intervenção terapêutica. Os mais promissores são drogas compostas como **bisfosfonatos**, que são ingeridos oralmente e tornam-se adsorvidos aos cristais apatita que constituem a porção mineral do osso; moléculas de droga podem persistir por longos períodos, como décadas ou mais. Quando os ossos contendo bisfosfonatos são dissolvidos, mais tarde, por osteoclastos, estes são corrompidos pelos bisfosfonatos liberados, o que os leva à apoptose. Ainda, bisfosfonatos são úteis para reduzir a carga das lesões osteolíticas em pacientes com vários tipos de cânceres metastáticos.

Quando camundongos imunocomprometidos carregando células de câncer de mama humanas são tratados com bisfosfonatos, o número de lesões osteolíticas é reduzido e, ao mesmo tempo, a carga total de células tumorais nesses animais é diminuída. Essas observações proporcionam indicações adicionais sobre a progressão tumoral, em que a proliferação dessas células de câncer de



mama depende muito da osteólise e da liberação de fatores de crescimento resultante do osso dissolvido. Além disso, a terapia com bisfosfonatos pode proporcionar benefícios adicionais a pacientes sofrendo de câncer de mama metastático (veja a Barra lateral 14.10). Recentemente, derivados de osteoprotegerina (OPG), que poderiam também bloquear o “ciclo vicioso”, foram encontrados em ensaios clínicos de fase inicial e reduziram substancialmente a taxa de dissolução do osso em pacientes com mielomas e cânceres de mama metastáticos.

Como poderia ser predito, lesões osteoblásticas dependem de outros sinais – que ativam osteoblastos mais do que osteoclastos. Nesse caso, a liberação por células de câncer metastáticas do fator de crescimento chamado “endotelina-1” (ET-1) tem um papel dominante na estimulação de osteoblastos e, ao mesmo tempo, reprimindo a atividade de osteoclastos. Então, células de câncer de próstata de tumores primários liberam endotelina; desde que seu receptor cognato seja também expresso por essas células de câncer, o resultado é uma alça estimulatória de crescimento autócrino. Entretanto, quando essas células chegam na medula, a endotelina que elas liberam também age via sinalização heterotípica para estimular osteoblastos, criando lesões osteoblásticas características dessa malignidade. (Precisamente como a ativação dos osteoblastos beneficia células de câncer de próstata não é muito bem-entendido. Seria plausível que osteoblastos ativados secretassem grandes quantidades de fatores de crescimento durante a construção do osso mineralizado, e que alguns desses fatores fossem desviados por células de câncer em metástases osteoblásticas.)

Desse modo, a metáfora de Paget da semente e solo é útil, mas está longe de ser suficiente. Como sementes, células metastáticas são lançadas em muitas direções, mas, uma vez que

Figura 14.47 Osteoblastos versus osteoclastos O balanço fisiológico entre formação de osso e reabsorção é criado por sinalização entre osteoblastos, que ligam ossos, e osteoclastos, que os dissolvem. Em um ciclo avançado, osteoclastos removem ossos mineralizados, cobrindo e fechando a seção do osso e secretando ácido digestivo no osso abaixo desses; isso é seguido por preenchimento osteoblástico de cavidades resultantes com novo osso. Os osteoblastos liberam RANKL, que age via receptor de RANK (*não-mostrado*) exibido por precusores de osteoclasto para induzi-los a maturar em osteoclastos funcionais. Os osteoblastos podem também secretar osteoprotegerina (OPG), que age como um receptor isca em uma cilada para RANKL antes que ele tenha tido a chance de ativar precusores de osteoclasto. Ainda, o balanço entre RANKL e OPG determina a velocidade da rede de crescimento/perda de osso.

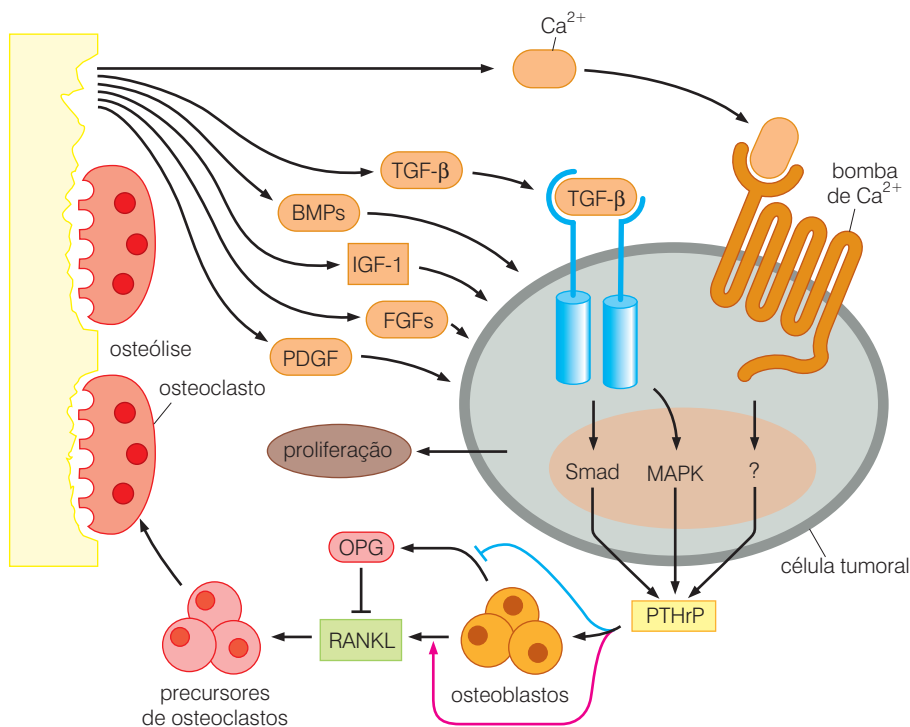


Figura 14.48 O ciclo vicioso de metástase osteolítica Liberado por células de câncer de mama (*direta, cinza*), PTHrP (peptídeo relacionado ao hormônio paratireoidal) ocasiona, em osteoblastos vizinhos, a troca da mistura de sinais liberados: eles aumentam a síntese de RANKL (*seta vermelha*) e diminuem a síntese de OPG (osteoprotegerina) (*linha azul*). RANKL induz precusores osteoclásticos a maturarem em osteoclastos funcionais (veja a Figura 14.47). Estes são responsáveis pela osteólise, que causa desmineralização do osso, expõe a matriz extracelular dentro do osso (Figura 14.45B) e resulta na liberação de TGF-β, Ca²⁺ e IGF-1 (*esquerda e centro, acima*). IGF-1 e Ca²⁺ causam proliferação e sobrevivência de células cancerosas, e a presença adicional de TGF-β induz células de câncer a liberarem mais PTHrP, resultando em uma alça de retroalimentação positiva de auto-sustentação que foi chamada de “ciclo vicioso” de metástase osteolítica. (De G.R. Mundy, *Nat. Rev. Cancer* 2: 584-593, 2002.)

chegam em certas áreas, elas podem ser descritas como participantes passivos no seu futuro destino. No entanto, essas células de câncer começam a ativamente cultivar o solo no qual elas chegaram, garantindo assim um ambiente fértil para sua própria proliferação e de seus descendentes.

14.11 Genes supressores de metástases contribuem na regulação do fenótipo metastático

Vimos, neste capítulo, vários genes que ativamente promovem alguns dos passos da cascata invasão-metástase. Muitos deles codificam fatores de crescimento familiares, receptores de fatores de crescimento ou proteínas de sinal de transdução, encontradas em nossas primeiras

Barra lateral 14.9 TGF- β e PTHrP têm papéis pivotais no ciclo vicioso de metástases osteolíticas de câncer de mama. Células de câncer de mama que enviam metástase para os ossos produzem mais PTHrP do que outras no mesmo animal que não enviam – uma reflexão sobre o fato de que certos fatores de crescimento liberados da ECM do osso estimulam a produção de PTHrP por células de câncer em metástase. O mais importante desses fatores derivados do osso é TGF- β , como ilustrado por alguns simples experimentos. Em um deles, o receptor de TGF- β dominante-negativo (que bloqueia a habilidade da célula em responder ao TGF- β) foi expressado em células de câncer de mama humano. Cada célula cessa a produção de PTHrP e perde a habilidade

de produzir eficientemente metástase osteolítica no osso (Figura 14.49). Em outro experimento, células de câncer de mama que geralmente não tem a habilidade em enviar metástase ao osso e falham em secretar TGF- β podem ser forçadas (por meio do uso de um vetor de expressão) a secretar TGF- β . Este então age de modo autócrino para estimular tais células a produzirem seu próprio PTHrP, permitindo-lhes formar um grande número de metástase em ossos. Finalmente, anticorpos que se ligam e neutralizam PTHrP são hábeis em bloquear a habilidade das células de câncer de mama humano em gerar lesões osteolíticas em camundongos. Essas são algumas das observações muito diferentes que têm inspirado o modelo do “ciclo vicioso” descrito na Figura 14.48.

células MDA-MB-231 transfectadas com:

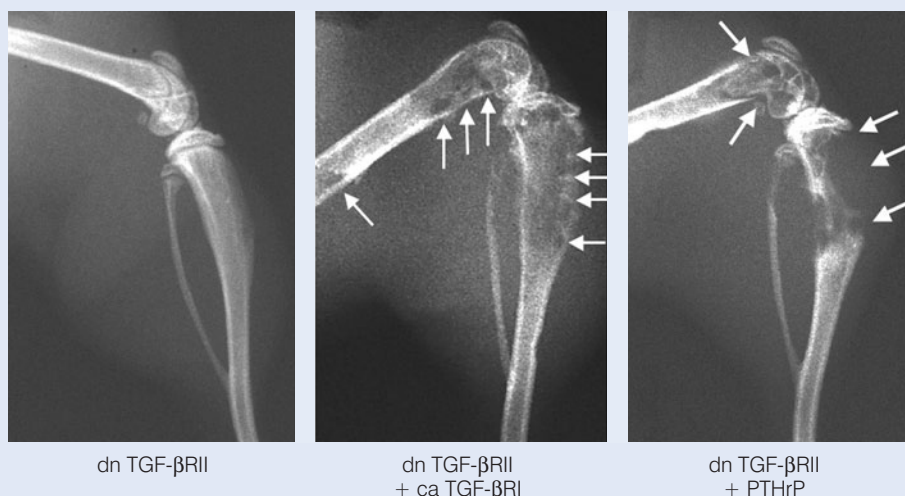


Figura 14.49 TGF- β e a formação de metástase osteolítica. Evidências que apoiam o modelo do “ciclo vicioso” de metástase osteolítica (Figura 14.48) vêm, em parte, de experimentos envolvendo o uso de células MDA-MB-231, uma linhagem de células de câncer de mama humano que em geral mostra uma alta tendência a produzir metástase osteolítica (veja a Figura 14.46B). A habilidade dessas células em fazê-lo é medida aqui por análise de raio X de membros inferiores de camundongos que sustentam xenoinxertos de tumor MDA-MB-231. Quando um construto de expressão do receptor de TGF- β do tipo II dominante-negativo (dn TGF- β RII) foi introduzido nessas células de câncer, essa proteína mutante bloqueou sua habilidade em responder a TGF- β , especificamente TGF- β que seria liberado da matriz extracelular de lesões osteolíticas que elas poderiam ter induzido. Sem o estímulo de TGF- β , essas células de câncer falham em formar metástases osteolíticas (*painel*

da esquerda). Entretanto, se essa inabilidade em responder a TGF- β é cancelada pela introdução, em tais células, do construto expressando especificamente um receptor de TGF- β do tipo I ativo (ca TGF- β RI) constitutivamente, a força delas em induzir lesões osteolíticas é restaurada (*setas, painel central*). Essa observação, por si só, não indica precisamente como o ca TGF- β RI tem sucesso em restaurar a atividade osteolítica dessas células. A explicação vem de um experimento no qual um vetor produzindo a expressão de PTHrP (em vez da expressão de ca TGF- β RI) é introduzido em dn TGF- β RI. Então elas retomam a habilidade em formar metástases osteolíticas (*setas, painel da direita*). Isso demonstra que TGF- β estimula atividade osteolítica forçando células de câncer de mama a liberar PTHrP, que procede em ativar osteoblastos e também osteoclastos (veja a Figura 14.48). (De J.J.Yin, K. Selander, J.M.Chirgwin et al., *J.Clin Invest.* 103: 197-206, 1999.)

discussões sobre oncogenes e seus mecanismos de ação. Quando introduzidos em uma variedade de células epiteliais, esses genes são hábeis em provocar mudanças, como transição epitelial-mesenquimal (EMT), aquisição de mobilidade celular e mesmo invasividade. Além disso, parece incrivelmente provável que a versão desregulada desses genes são as forças primárias dirigindo muitos dos passos da invasão e metástase.

De forma importante, as proteínas resultantes desses vários genes operam como componentes do circuito regulatório complexo que governa muitos aspectos da fisiologia celular. E, como todos os circuitos bem-desenhados, existem reguladores positivos e, em contrapartida, reguladores negativos, com o objetivo de assegurar um rendimento modulado perfeitamente. Essa lógica leva à conclusão de que devem existir vários elementos controladores operando em células que impedem e equilibram as ações de invasividade e metástase dos efetores positivos de malignidade avançada. Esses reguladores negativos, em analogia a supressores tumorais, têm sido chamados de genes *supressores de metástases*.

Como se poderia antecipar, esses supressores de metástases operam em vários níveis na regulação dos passos de invasão e metástase, que vão desde os principais reguladores ativados pleiotropicamente e proteínas de sinal de transdução até os efetores finais de várias mudanças bioquímicas (Tabela 14.4). Eles têm sido identificados por meio de uma variedade de estratégias experimentais. Bastante freqüentemente, suas expressões em tumores primários e sua muito baixa expressão em metástases derivadas sugerem um importante papel em bloquear os últimos passos da progressão maligna.

Tais observações, sendo apenas correlações, não provam papéis *causais* na prevenção de metástases, as quais podem ser demonstradas apenas por meio de outros tipos de experimentos. Por exemplo, o papel de um gene candidato a um autêntico gene supressor de metástase pode ser testado por um critério operacional simples: quando a expressão de genes é forçada em células de tumor primário, ela pode permitir a expansão contínua da massa tumoral enquanto, ao mesmo tempo, bloqueia o surgimento de metástases distantes que são geralmente espalhadas por esse tumor e por outros como ele? Alguns desses genes passaram pelo teste, enquanto outros agem de uma maneira menos específica, inibindo proliferação por todos os tipos de célula, incluindo algumas em que faltam propriedades invasivas e metastáticas. Ainda, outros candidatos a genes supressores foram encontrados suprimindo metástases em apenas um pequeno grupo de tipos de tumores malignos.

O primeiro desses genes a ser descoberto – *NM23* – foi descrito em 1988, por reduzir forças metastáticas em células de melanoma de camundongos. Pesquisas subseqüentes indicam que ele suprime a mobilidade e invasividade de células *in vitro*. Sua habilidade em suprimir forças metastáticas de tumores experimentais também tem sido descrita. O mecanismo bioquímico de ação da proteína NM23 pode ser relacionado com sua habilidade em formar complexos físicos com a proteína KSR, que serve como proteína suporte que induz muitas cinases da cascata ERK-MAPK (Seção 6.5), com o objetivo de facilitar a rápida e eficiente transferência de sinais entre elas. Além disso, NM23 pode

Barra lateral 14.10 Lesões osteolíticas provocam destruição em outras vias
Além dos defeitos corrosivos de lesões osteolíticas no esqueleto, incluindo dores de ossos graves e fraturas, a osteólise tem um outro efeito sutil: a degradação em grande escala do mineral do osso leva a **hipercalcemia** – concentrações elevadas de cálcio na circulação. Ao mesmo tempo, PTHrP (peptídeo relacionado ao hormônio paratiroideial) liberado na circulação por metástase de osso induz os rins a secretarem menos cálcio na urina, aumentando os níveis de cálcio no sangue. Essa hipercalcemia, que geralmente assinala estágios finais de doença maligna, causa uma grande variedade de sintomas, incluindo problemas gastrintestinais, no trato urinário, cardiovasculares e neuropsiquiátricos. A hipercalcemia pode ser substancialmente reduzida por tratamento dos pacientes com bifosfonatos (para reduzir osteólise) e com anticorpo anti-PTHrP (para aumentar a excreção de cálcio pelos rins).

Tabela 14.4 Candidatos a genes supressores de metástases

Nome	Localização celular	Mecanismo de ação
<i>BRMS1</i>	proteína nuclear	envolvida no remodelamento da cromatina
<i>CRSP3</i>	proteína nuclear	fator de transcrição
<i>KAI1/CD82</i>	proteína transmembrana	associação célula-célula (?)
<i>KISS1</i>	proteína secretada	ligante de receptor acoplado à proteína G
<i>NM23</i>	cinase citoplasmática	regulador da cascata MAPK (?)
<i>RhoGDI-2</i>	proteína citoplasmática	regulador negativo da ação de Rho
<i>SseCKs</i>	citoplasma	proteína associada a citoesqueleto
<i>VDUP1</i>	citoplasma	regulador da cascata de MAPK (?)
<i>CDH1 (=E-caderina)</i>	proteína de adesão de superfície celular	favorece a formação de camadas de células epiteliais
<i>TIMPs</i>	proteína secretada	inibidor de metaloproteínases
<i>MKK4</i>	citoplasma	proteína cinase componente da cascata MAPK

Adaptada, em parte, de P.S.Steeg, *Nat. Rev. Cancer* 3: 55-63, 2003.

afetar forças metastáticas de células por meio da sua habilidade em modular o fluxo de sinais que passam por essa sobrevivência crítica e caminho mitogênico. NM23 tem também sido descrita com funções variáveis, como nucleosídeo difosfato cinase (que converte nucleosídeos difosfatos em trifosfatos), uma histina cinase ou uma serina cinase. Estudos do gene de *Drosophila* homólogo a NM23, chamado *awd*, indicam que este age durante o desenvolvimento para suprimir migração celular não-esperada. Sua candidatura como supressor é complicada pelo fato de que tem sido descrito que ele é superexpresso em carcinomas de ovário, gástrico e cólon adiantados, bem como em sarcomas.

A molécula E-caderina, sobre a qual muito tem sido dito neste capítulo, é também considerada produto de gene supressor de metástase. Seu papel em estabilizar o contato célula-célula em camadas epiteliais e na prevenção de transição epitelial-mesenquimal (Seção 14.3) claramente coloca-a entre os principais obstáculos moleculares que bloqueiam a aquisição do fenótipo celular de invasividade. Como vimos, sua expressão é perdida em carcinomas invasivos por meio de uma variedade de mecanismos. De modo similar, pode-se facilmente imaginar como metaloproteínases inibidoras de tecido (TIMPs), que se ligam e inativam MMPs no espaço intercelular, poderiam bloquear vários passos de invasão e metástases.

Um outro gene supressor de tumor codifica a proteína KAI1/CD82, que atravessa a membrana plasmática quatro vezes. Descobriu-se que sua expressão é substancialmente reprimida em muitos carcinomas avançados de pulmão, pâncreas, próstata, cólon e gástrico. Uma baixa perspectiva para pacientes com câncer de mama está associada a uma baixa expressão de KAI1 em suas células cancerígenas. Em células cultivadas, KAI1 suprime migração e invasibilidade e, ao mesmo tempo, aumenta sua agregação umas com as outras. Sua localização próximo a junções aderentes é compatível com o papel desempenhado em adesões célula-célula. Também se verificou que KAI1 age como antagonista de sinalização de receptores de EGF.

Outro gene de interesse codifica a proteína KISS1, que foi hipoteticamente identificada como um ligante de receptor acoplado à proteína G de uma superfície celular (GPCR; veja a Seção 5.7). A expressão ectópica do gene *KISS1* em células tumorais suprimiu suas tendências metastáticas sem afetar o crescimento dessas células em tumores primários. Como muitos outros nesta classe de genes, seu papel bioquímico preciso na supressão metastática é muito pouco entendido.

Há ainda muitos candidatos para supressores de metástases. O inibidor 2 de dissociação do nucleotídeo guanina Rho (RhoGDI-2) é um regulador negativo de proteínas Rho, que age sequestrando formas ligadas de GDP dessas proteínas no citoplasma, prevenindo-as de remodelar o citoesqueleto de actina (Seção 14.7). A expressão desse gene codificado foi correlacionada inversamente com tendências invasivas de um grande grupo (105) de carcinomas de bexiga. Dados os papéis críticos de proteínas tipo Rho em mobilidade e invasividade celular, RhoGDI-2 torna-se um candidato atraente por ser um inibidor de invasividade e metástase de células de câncer.

O gene supressor 1 de metástases de câncer de mama (*BRMS-1*) foi identificado pela sua expressão diminuída em metástases de câncer de mama. Sua expressão ectópica em carcinoma de mama e células de melanoma suprimiu suas tendências metastáticas sem afetar sua tumorigenicidade. Ele tem sido descrito por aumentar a comunicação *gap*-juncional entre células, a qual envolvem canais que permitem a células adjacentes trocar moléculas de peso molecular menor de 10^3 . Ao mesmo tempo, a proteína BRMS-1 têm sido encontrada em núcleos como parte de um complexo de proteínas envolvidas em remodelamento de cromatina. Evidentemente, esses papéis discrepantes necessitam ser revistos no futuro.

Pesquisas em genes supressores de metástases estão ainda em sua “infância” e, em muitos casos, mecanismos moleculares claros e definitivos precisam ainda emergir. Alguns dos genes dessa categoria, incluindo E-caderina, RhoGDI-2 e TIMPs, produzem proteínas que são

parte de mecanismos bioquímicos de invasão e metástase conhecidos. As conexões bioquímicas entre muitos outros candidatos a proteínas supressoras de metástases e fenótipos de células malignas são menos aparentes. Até que esses genes tenham sido inativados em genomas de células de tumores humanos, tanto por mutação como por metilação de promotor, seus envoltórios em fenótipos malignos resultantes nessas células permanecem obscuros.

14.12 Micrometástases ocultas ameaçam a sobrevivência de longa duração de pacientes com câncer

Neste capítulo, lemos repetidamente sobre a extraordinária ineficiência com as quais as metástases são produzidas. Algumas dessas ineficiências metastáticas são criadas por profundas dificuldades nos passos iniciais da cascata invasão-metástase em células de câncer. Muitas das células cancerosas que chegam a locais distantes e sobrevivem a estes novos locais falham em formar metástases clinicamente detectáveis. O resultado é a presença de micrometástases miríades espalhadas pelos tecidos de muitos pacientes de câncer.

Enquanto micrometástases são, com raras exceções, incapazes de se expandir e formar metástases clinicamente detectáveis, elas dão claras indicações de que o tumor primário espalhou células pelo corpo. Essas micrometástases representam uma ameaça à sobrevivência por longos períodos de pacientes com câncer, no mínimo porque algumas delas podem se transformar em metástases macroscópicas clinicamente significativas, plenas, anos após terem sido implantadas em algum tecido distante. Cânceres de mama são conhecidos por desencadear relapsos uma ou mesmo duas décadas após o tumor primário ter sido removido e o paciente ter sido declarado livre de câncer.

Em um estudo de pacientes com câncer de mama, micrometástases foram detectadas por amostragem da medula óssea da crista ilíaca da pélvis. Cerca de 1% da população de pacientes padecendo em condições não-malignas mostrou células positivas para citoqueratina (i. e., células epiteliais) em suas medulas. Em contraste, 36% de pacientes com câncer de mama carregando tumores de estágios I, II ou III tiveram tais micrometástases em suas medulas. A presença dessas micrometástases na medula provou ser um marcador prognóstico altamente útil para o risco de relapso com metástases clinicamente detectáveis (Figura 14.50A). Então, em quatro anos, um quarto dos pacientes positivos para medula morreram de câncer, enquanto apenas 6% deles, sem célula de câncer nas suas medulas, morreram dessa doença. A presença de micrometástase nesses pacientes representou um aumento em torno de quatro vezes do risco de relapsos finais ou morte por essa doença. Um outro estudo encontrou um aumento de mais de 10 vezes no risco de morte em câncer de mama entre aqueles cuja medula tinha micrometástases compostas por células únicas ou por pequenos grupos de células de câncer.

Pacientes com câncer de cólon que passaram por **reseção** (excisão cirúrgica) de seus tumores primários freqüentemente aparecerão, um ano ou dois mais tarde, com um pequeno número de metástases em seus fígados, mas não em outros lugares; essas metástases podem então ser removidas cirurgicamente, com freqüência com significativo benefício clínico. Mais uma vez, micrometástases na medula da pélvis podem ser anotadas. Cerca de 90% de pacientes sem essas micrometástases sobrevivem ainda 15 meses mais, enquanto apenas 30% dos pacientes que carregam micrometástase sobrevivem até esse ponto (Figura 14.50B).

Um procedimento usado para tratamento de câncer de esôfago proporciona ainda uma outra dica na disseminação metastática. Esses tumores são freqüentemente tratados com cirurgia, que necessita da remoção de um ou mais segmentos de costela, dos quais a medula pode ser facilmente retirada. Dois estudos independentes informaram que 79 e 88% desses pacientes, respectivamente, abrigaram micrometástases de carcinoma na medula de suas costelas no momento da cirurgia. Esses números, que contrastam com cerca de 30% dos pacientes com micrometástases de câncer de mama diagnosticados inicialmente estão correlacionado com o prognóstico severo para pacientes sofrendo desse tipo de câncer.

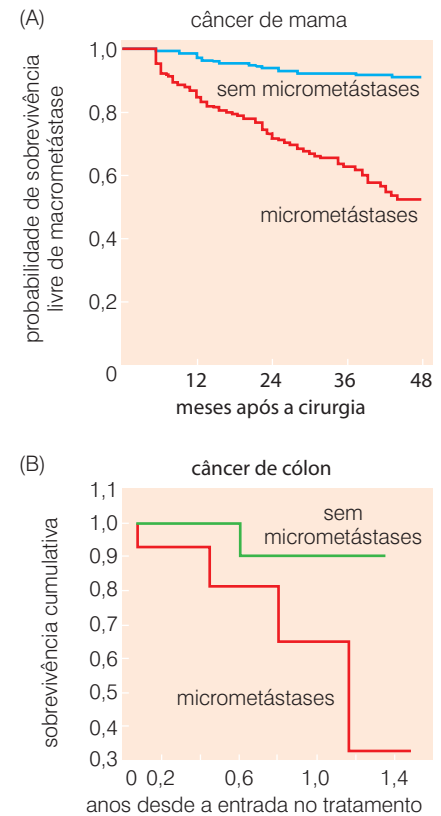


Figura 14.50 micrometástase e prognóstico clínico (A) Este gráfico de Kaplan-Meier apresenta a proporção de pacientes com câncer de mama que sobrevivem livres de metástases macroscópicas distantes em função do tempo decorrido seguido do tratamento cirúrgico inicial dos seus tumores primários. Os pacientes com micrometástases na medula óssea no momento da cirurgia (*linha vermelha*) sofreram uma taxa de reincidência muito maior do que aqueles cujas micrometástases não existiam (*linha azul*). (B) Padrões surpreendentemente similares caracterizam a probabilidade de sobrevivência de um grupo de 54 pacientes com câncer de cólon, nenhum apresentando metástase aparente fora do fígado no momento do diagnóstico pré-operatório; todos foram tratados cirurgicamente para remover grandes metástases do fígado. Aqueles cuja medula óssea não apresentou células metastáticas positivas para citoqueratina tiveram um curso clínico mais favorável (*curva verde*) do que aqueles cuja medula carregou células de câncer (*curva vermelha*). Nesse caso, a fração de pacientes sobreviventes (*ordenada*) está apresentada *versus* o tempo em anos desde o tratamento inicial e sua inclusão no estudo clínico. (A, de S. Braun, K. Pantel, P. Muller et al., *N. Engl. J. Med.* 342: 525-533, 2000; B, cortesia de R.A. Tollenaar.)

Barra lateral 14.11 Todas as micrometástases são verdadeiramente dormentes? A dormência de doenças micrometastáticas poderia, com frequência, ser uma ilusão. Então se poderia imaginar que, em muitos pacientes com “doença residual mínima” seguindo remoção dos seus tumores primários, clones micrometastáticos algumas vezes adquirem a habilidade colonizar e, conseqüentemente, criar uma nova cascata de disseminação metastática e relapso da doença (veja a Figura 14.11). De maneira importante, tal alteração do fenótipo celular (e possivelmente uma alteração de genótipo) tem uma baixa probabilidade, por geração celular, de ocorrer em populações que não crescem, células dormentes. Além disso, observações extensivas feitas durante muitos anos indicam que essas mudanças ocorrem espontaneamente apenas em populações de células em proliferação. Ainda, em muitos pacientes com doença residual mínima, alguns clones de células de câncer micrometastáticas devem passar através de repetidos ciclos de divisão e crescimento, ocasionalmente deixando variantes que, devido a algum acidente aleatório, adquirem habilidade em colonizar. (Essas micrometástases poderiam permanecer clinicamente não-arentes por muitos anos simplesmente porque a taxa de proliferação celular nesses crescimentos é balanceada por uma taxa igual de apoptose celular.)

A literatura sobre melanoma providencia testemunho dramaticamente igual sobre o perigo de longo prazo apresentado por micrometástases dormentes, **ocultas** (i. e., escondidas e aparentemente não-crescentes). Em um caso particularmente bem-documentado, rins foram preparados para transplante de órgãos de um cadáver de um paciente que sofreu ressecção de um pequeno melanoma 16 anos antes. O paciente foi seguido proximamente por 15 anos depois da remoção desse pequeno tumor primário e permaneceu livre de sintomas. Entretanto, logo após o transplante, os dois receptores desses rins desenvolveram melanomas agressivos que foram originados diretamente do seu doador.

Os mecanismos que previnem micrometástases de explodirem em crescimentos clinicamente ameaçadores são pouco entendidos. Em algumas instâncias, se pode observar micrometástases crescendo como punhos ao redor de pequenos vasos; isso sugere que elas falhem em suas próprias capacidades angiogênicas, mas, apesar disso, sejam hábeis em tomar vantagens limitadas dos vasos vizinhos. Na grande maioria das micrometástases encontradas na medula, as células envolvidas faltam com alguns indicadores para marcadores de proliferação celular e, então, em um estado não crescente, tipo G0, por extensos períodos (veja a Figura 14.12), talvez por meses e, mesmo, anos (veja, entretanto, a Barra lateral 14.11). (Pelo fato de essas células serem não-crescentes, elas podem ser especialmente resistentes a tratamentos quimioterápicos designados para eliminar a doença residual que persiste seguida da remoção cirúrgica do tumor primário.)

Mecanismos imunes podem também contribuir suprimindo o crescimento de micrometástases, conseqüentemente prevenindo relapso da doença metastática. Isso é sugerido pelo crescimento explosivo observado ocasionalmente, de tumores metastáticos agressivos, em receptores imunossuprimidos de transplante de órgãos. Além disso, o fenômeno de células-tronco tumorais poderia ajudar a explicar a inabilidade da grande maioria de micrometástases disseminadas inicialmente em gerar macrometástases. Afora isso, relativamente pouco se sabe sobre os mecanismos que impedem muitas micrometástases de colonizarem com sucesso os tecidos nos quais elas chegaram.

14.13 Sinopse e perspectivas

Como todos os outros fenótipos biológicos, aqueles que contribuem para invasão e metástase devem ser dirigidos pelas ações de genes. Muitas questões essenciais têm complicado a procura de determinantes genéticos desses fenótipos agressivos de câncer: eles são programados por um pequeno número de ações pleiotrópicas, por genes controladores principais ou pelas ações de múltiplos genes que colaboram para criá-los? Esses genes sofrem mutações durante a progressão tumoral ou se tornam envolvidos nos últimos passos da progressão tumoral por meio de mecanismos epigenéticos que controlam suas expressões? Eles são controladores principais especializados em programar os fenótipos de invasão e metástase ou esses comportamentos são subprodutos das ações de oncogenes familiares e genes supressores tumorais?

Enquanto mecanismos genéticos envolvidos em metástase permanecem obscuros, algum progresso está sendo feito para resolver um outro “quebra-cabeça”: Seriam as células dentro do tumor primário quem efetua raras variantes de invasão e metástase (entre as grandes populações de células tumorais) que adquiriram, por algum acidente genético ou epigenético, a habilidade de executar esses passos? Ou são todas as células de câncer, dentro de certos tumores primários, igualmente capazes de invadir e fazer metástases (embora com uma extraordinária baixa eficiência), enquanto a grande maioria das células de câncer em outros tumores não tem tais habilidades? Análises recentes do padrão de expressão gênica de vários tumores humanos pesaram a favor do segundo mecanismo. Ainda assim, essa questão permanece muito discutida.

Um desses estudos indica que a tendência a fazer metástase está associada a um padrão particular de expressão gênica em alguns, mas não em todos, os cânceres de mama humanos. Mais ainda, esse padrão de expressão é manifestado na maioria das células de cada grupo de tumores primários, em vez de em pequenos conjuntos de células dentro de cada tumor (Figura 14.51). Isso

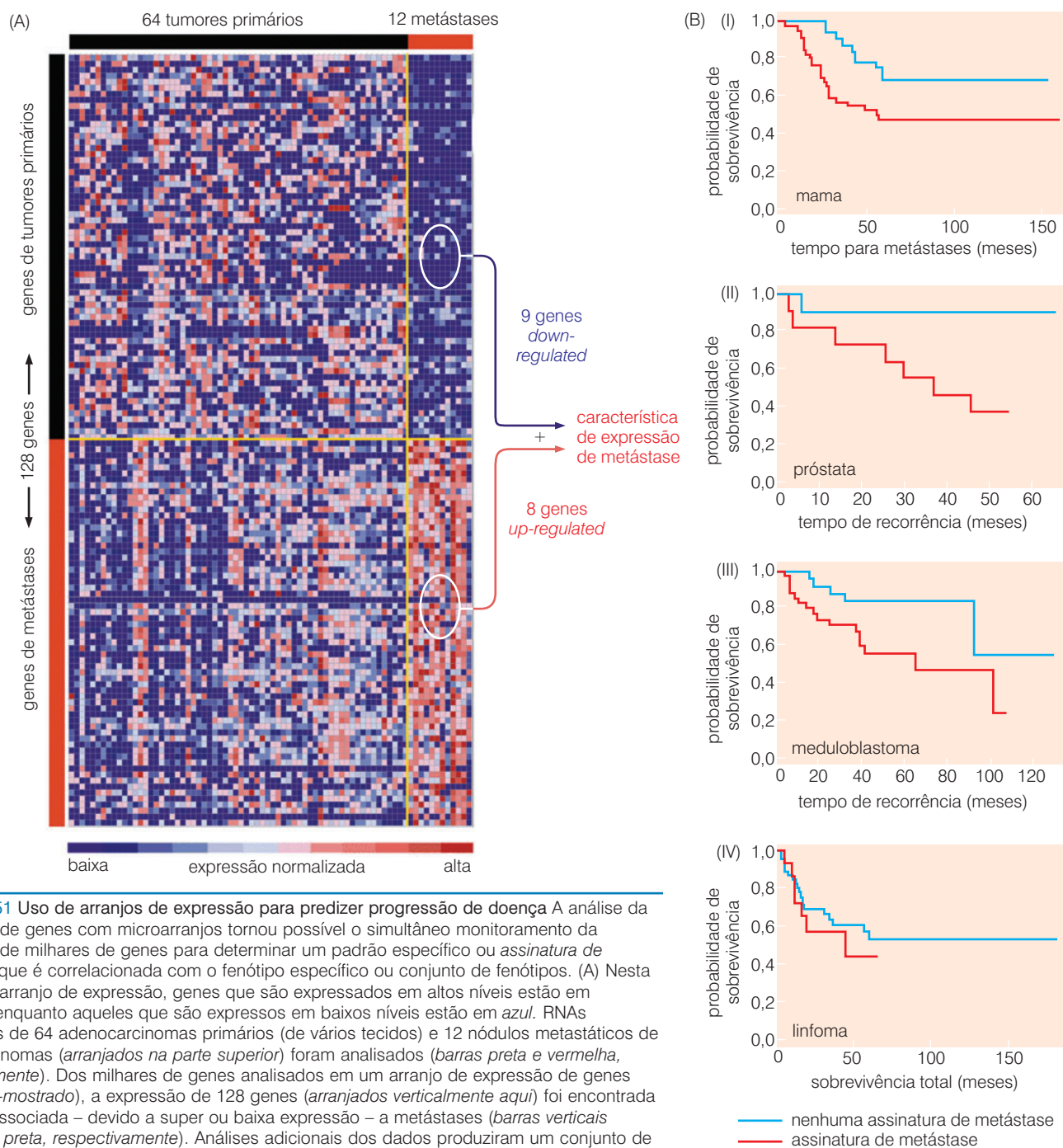
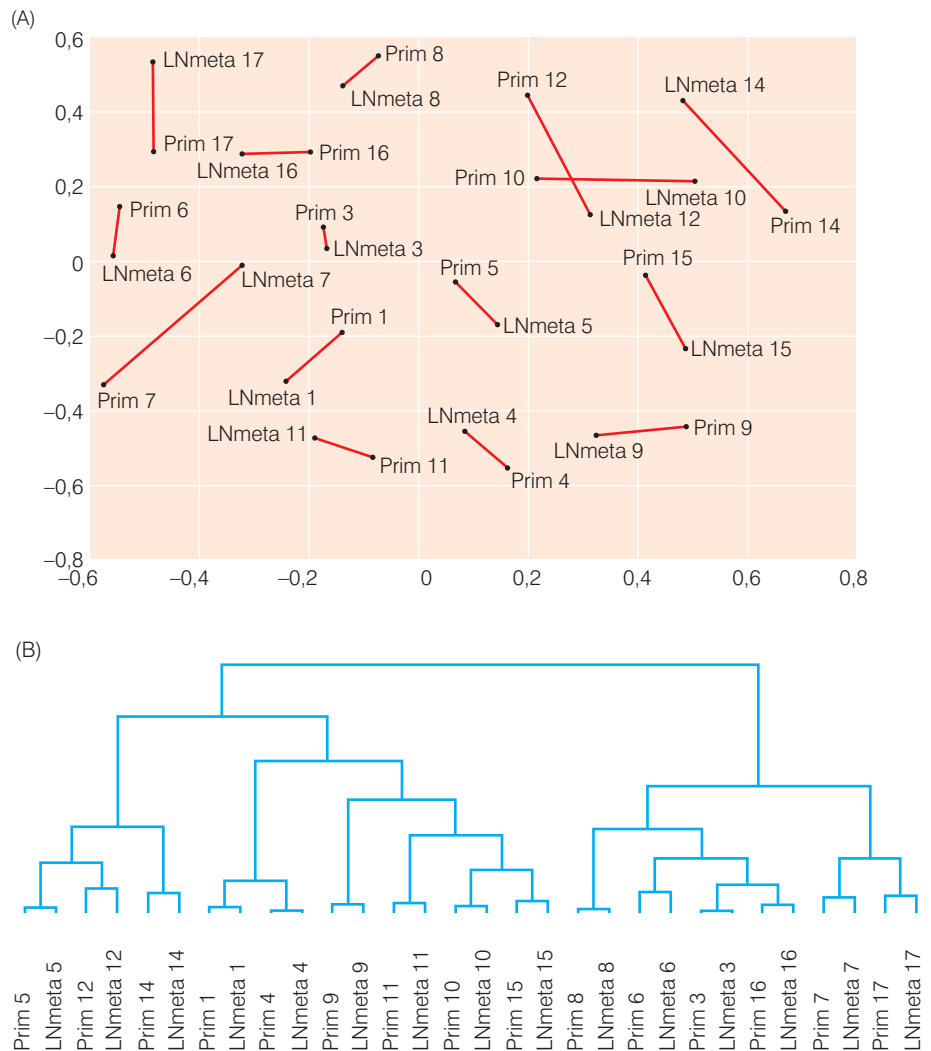


Figura 14.51 Uso de arranjos de expressão para prever progressão de doença A análise da expressão de genes com microarranjos tornou possível o simultâneo monitoramento da expressão de milhares de genes para determinar um padrão específico ou *assinatura de expressão* que é correlacionada com o fenótipo específico ou conjunto de fenótipos. (A) Nesta análise de arranjo de expressão, genes que são expressados em altos níveis estão em *vermelho*, enquanto aqueles que são expressos em baixos níveis estão em *azul*. RNAs preparados de 64 adenocarcinomas primários (de vários tecidos) e 12 nódulos metastáticos de adenocarcinomas (*arranjados na parte superior*) foram analisados (*barras preta e vermelha, respectivamente*). Dos milhares de genes analisados em um arranjo de expressão de genes inicial (*não-mostrado*), a expressão de 128 genes (*arranjados verticalmente aqui*) foi encontrada por estar associada – devido a super ou baixa expressão – a metástases (*barras verticais vermelha e preta, respectivamente*). Análises adicionais dos dados produziram um conjunto de 17 genes, cuja expressão foi tão útil quanto o conjunto maior de 128 genes em distinguir metástases de tumores primários. De maneira importante, essa assinatura de expressão específica de metástases foi encontrada sendo apresentada por um pequeno subgrupo de tumores primários analisados inicialmente, sugerindo que isso poderia ser usado para prever tendências metastáticas de outros grupos de tumores humanos. (B) Quando pesquisadores usaram a expressão característica de metástases do painel A para analisar padrões de expressão gênica de outros grupos de tumores primários, eles foram capazes de separar pacientes portando adenocarcinomas de mamas (I) e próstata (II), bem como meduloblastomas (III) em dois grupos (*linhas azul e vermelha*) tendo marcadamente diferentes tempos para progressão clínica ou relapso seguindo a cirurgia inicial. Entretanto, não foi possível prever a progressão clínica de linfomas (IV) usando características de expressão específica de metástases, o que sugere que um conjunto comum de genes está envolvido mediando metástases em tumores sólidos e outros genes desconhecidos medeiam a progressão maligna em metástases em tumores hematopoiéticos. (De S. Ramaswamy, K.N. Ross, E.S. Lander e T.R. Golub, *Nat. Genet.* 33:49 – 54, 2002.)

Figura 14.52 Similaridade genética entre tumores primários e metástases derivadas. Arranjos de expressão gênica podem ser usados para classificar diferentes tipos de tumores primários e metástases derivadas de acordo com seus respectivos perfis de expressão gênica (p. ex., veja a Figura 14.51). Se isso é feito, o grau de similaridade entre pares de biópsias pode ser calculado usando-se métodos estatísticos. (A) Como visto aqui, biópsias de tumores primários e linfonodos derivados de um grupo de pacientes (cada paciente identificado por um número) têm sido colocadas em um mapa bidimensional, no qual a proximidade indica similaridade no padrão de expressão de genes. Isso revela que a grande maioria dos tumores primários (Prim) localiza-se perto das suas metástases de linfonodos derivadas (LNmeta), indicando similaridade no padrão da expressão gênica. (B) Alternativamente, padrões de expressão gênica podem ser usados para mapear relações entre metástases primárias e derivadas, em que o grau de relação está colocado em um *dendograma* – isto é, as amostras de tumor mais intimamente relacionadas são colocadas perto umas das outras na mesma ramificação ou ramificação vizinha. Uma vez ainda, o padrão de expressão gênica de uma metástase é, quase sempre, mais fortemente relacionado ao tumor primário parental do qual ele se originou. (Cortesia de B. Weigelt e L.J.van 't Veer.)



sugere que a tendência para fazer metástase foi desenvolvida durante o curso múltiplas etapas da progressão que culminou na formação do tumor primário, e não após, por uma pequena e especializada subpopulação de células cancerígenas dentro de um tumor primário. (Se a habilidade em formar metástases fosse limitada a somente uma pequena minoria de células cancerígenas no tumor primário, seu padrão de expressão gênica não influenciaria significativamente o padrão de expressão da população de células do tumor como um todo, e essa população maior não se manifestaria, então, como uma expressão gênica característica com tendência à metástase.)

Uma outra análise indicou uma forte semelhança entre o padrão de expressão de genes da massa de células em um tumor primário e aquele presente em suas metástases derivadas; isso é verdade para 15 pares de tumores primários e metástases associadas (Figura 14.52). Se validado mais detalhadamente, isso significa que células de câncer no tumor primário não necessitam sofrer mudanças maiores na expressão de genes com o objetivo de fazer metástase e colonizar locais distantes.

A idéia de que grandes massas de células em certos tumores primários são capazes de fazer metástase recebe suporte adicional do fenômeno “câncer desconhecido primário” (CUP), que constitui cerca de 5% do total dos casos em oncologia clínica. Nesses casos, crescimentos metastáticos representam a primeira indicação clínica de que um paciente está abrigando câncer. Em cerca de 30% desses pacientes, tumores primários não são nunca detectados, enquanto nos 70% remanescentes os primários são encontrados apenas após a autópsia.

Na grande maioria desses casos CUP, tumores primários provavelmente eram muito pequenos quando começaram a disseminar células metastáticas. Dada a profunda ineficiência das metástases (possivelmente tão baixo quanto 10^{-6} a 10^{-8} a probabilidade de sucesso) e os pequenos tamanhos das populações celulares desses tumores primários, parece plausível que a grande massa de células nesses primários foram capazes de disseminar uma progênie metastática. E, como antes, parece provável que a evolução genética que produziu células tumorogênicas nesses tumores primários simultaneamente criou populações celulares, todas cujos membros tiveram habilidade para disseminar sua progênie para locais distantes no corpo.

Enquanto nenhum desses estudos representa uma evidência inatacável, eles proporcionam um apoio para o argumento de que células metastáticas são extraídas das populações gerais de células no tumor primário em vez de em subclones de células pequenos, especializados, geneticamente não-representativos. Se essa linha de pensamento fosse finalmente validada, poderia se sugerir que a razão pela qual relativamente poucas metástases macroscópicas são formadas não é o fato de que existem poucas células dentro de tumores primários que são intrinsecamente competentes e qualificadas para fazer metástases. Além disso, a maioria das células em certos tumores primários pode ser favorecida com habilidade metastática, e muitas delas poderiam viajar para locais anatomicamente distantes. Entretanto, o número real de metástases macroscópicas que são finalmente formadas pode ser muito limitado por ineficiências metastáticas. Algumas especulações sobre a evolução genética de competência metastática reforçaria mais ainda essa noção.

Resultados contrários derivam, entretanto, de experiências em camundongos nos quais se permitiu que tumores primários fizessem metástases, por exemplo, para pulmões. Como descrito neste capítulo, células isoladas dessas metástases pulmonares têm sido encontradas, em diversos locais, por terem uma maior capacidade de fazer metástases para os pulmões do que grande parte das células no tumor primário. Tais observações indicam fortemente que essas células metastáticas são, no mínimo, marginalmente diferentes da maioria das células do tumor primário e que seus genótipos ou programas de expressão gênica facilitam uma maior habilidade metastática. Isso sugere, por outro lado, que essas células metastáticas de fato representam somente uma subpopulação minoritária no tumor primário e que provavelmente são variações que apareceram relativamente tarde na progressão tumoral.

Se um ou outro modelo de metástase for finalmente validado, fica claro que as identidades dos genes que estão envolvidos especificamente na programação metastática são elusivos. Além disso, tem sido difícil entender precisamente como certos genes tornam-se funcionalmente ativos durante os múltiplos passos da cascata de invasão e metástase. Uma resolução experimental desses problemas é confundida por complicações em todos os níveis.

1. A primeira dimensão de dificuldade deriva da complexidade do processo de invasão-metástase. Dados os diferentes passos que estão envolvidos nesse processo, existe um número comparável de genes envolvidos? Ou células de câncer que fazem metástase ativam e tiram vantagem de programas de desenvolvimento latentes preexistentes (Seção 14.3), como transição epitelial-mesenquimal (EMT), que simultaneamente concedem uma habilidade em executar múltiplos passos, incluindo abertura da membrana basal, invasão do estroma, intravasação e extravasação (Barra lateral 14.12)?
2. Análises experimentais são complicadas pelas ineficiências dos processos metastáticos quando comparadas com outros passos na patogênese do tumor. Mesmo quando células de câncer significativamente adquirem genótipo e fenótipo, permitindo metástases, elas seguem em fazer metástase com extraordinária baixa eficiência. Tal conexão fraca entre genótipo e fenótipo mensurável dificulta a maioria das estratégias experimentais atualmente disponíveis.
3. Uma outra complexidade surge da aparente colaboração entre fatores genéticos e epigenéticos em criar uma característica metastática. Lembre, por exemplo, que em certos modelos experimentais de câncer, a transição epitelial-mesenquimal (EMT) é alcançada quando células transformadas *ras* são expostas a TGF- β (Seção 14.4). Essa transição,

Barra lateral 14.12 A cascata invasão-metástase precisa ser reconfigurada?

A cascata invasão-metástase é frequentemente descrita como uma sucessão de seis passos distintos (invasividade localizada, intravasação, translocação, extravasão, formação de micrometástases e colonização; veja a Figura 14.4). Esse esquema poderia implicar que células de câncer precisariam adquirir habilidade para executar cada um desses passos por meio de um número comparável de alterações genéticas e epigenéticas de seus genomas. Entretanto, forças pleiotrópicas de fatores de transcrição que induzem EMT (TFs) e evidências reunidas da evolução genética de micrometástases (veja, por exemplo, a Barra lateral 14.4) logo poderiam transformar a descrição da cascata invasão-metástase. Em muitos tumores, um processo de três passos poderia ser uma descrição muito mais apropriada. O *primeiro passo* poderia envolver a ativação da expressão de um ou mais desses TFs e a concomitante aquisição da habilidade para invadir, intravasar, translocar para um local distante, extravasar e formar micrometástases. Então, muitos tumores primários (p. ex., 30% de cânceres de mama humanos) poderiam ser capazes de disseminar micrometástases mesmo quando são bastante pequenos, porque a grande maioria das células nesses tumores expressam um ou mais TFs indutores de EMT. O *segundo passo* poderia envolver aquisição de habilidade de colonização, que poderia ser executada apenas por raras micrometástases, frequentemente anos após serem disseminadas em vários locais do corpo. O *terceiro passo* poderia ocorrer quando cada micrometástase, agora crescendo em macrometástase, espalha no corpo células metastáticas que são capazes de colonizar, gerando recidiva clínica com doença metastática, largamente disseminada.

que poderia operar em muitos carcinomas humanos facilitando suas invasividades, pode ser disparada por sinais específicos de células geneticamente alteradas encontradas em alguns microambientes teciduais. Ainda, nesses casos, invasão e subsequente metástase podem ser bem-retratadas como características geneticamente modeladas e, por essa razão, não são facilmente estudadas por técnicas experimentais em geral usadas.

4. Em muitos tumores, genes e proteínas que participam diretamente de programar invasão e metástase podem ser expressados apenas no limite invasivo de tumores primários (veja a Figura 14.19), e as células de câncer nessas margens invasivas podem representar apenas uma pequena fração de populações de células neoplásicas nesses tumores. Isso complica enormemente experimentos planejados para mostrar bases bioquímicas e genéticas de invasividade e habilidade metastática, os quais com frequência contam com a análise de massas de populações de células de câncer preparadas a partir de grandes pedaços de tumores retirados cirurgicamente.
5. Carcinomas constituem a classe mais comum de cânceres humanos, e as células epiteliais neoplásicas dentro desses tumores podem necessitar passar por EMT com o objetivo de tornarem-se invasivas e metastáticas. Entretanto, se células de carcinoma invasivas passam através de uma EMT completa e abrigam todas as características epiteliais, elas se tornam os proverbiais “lobos em pele de cordeiro”, uma vez que muitas análises histológicas usadas comumente não permitem distinguir essas células de células mesenquimais não-neoplásicas do estroma associado ao tumor. (De fato, essa dificuldade explica por que muitos patologistas de tumor negam a verdadeira existência de EMT como processo-chave no desenvolvimento de invasividade de carcinomas.)
6. Dormência metastática cria um outro problema experimental. No caso de cânceres de mama, por exemplo, metástases podem repentinamente aparecer até 20 anos depois que o tumor primário inicial foi removido. Por causa desse longo período de latência e um número absoluto de micrometástases carregadas por vários pacientes, têm sido difícil de aprender como apenas um pequeno número delas, repentinamente, adquire a habilidade de crescer rapidamente e tornar-se macroscópica, tumores ameaçadores da vida.

Essas dificuldades experimentais têm retardado muito o progresso da pesquisa sobre invasão-metástase, deixando ainda muitas questões fundamentais não-respondidas. Por exemplo, realmente existem genes que são especializados em transmitir um fenótipo invasivo ou metastático para células de câncer? E, na mesma linha, existem genes supressores especializados em metástases (Seção 14.11) que necessitam ser inativados antes que a população de células tumorais possa adquirir habilidades invasivas e/ou metastáticas? Ou genes e proteínas que afetam metástases operam como componentes de circuitos regulatórios que temos encontrado repetidamente neste livro, chamados circuitos governados por produtos de oncogenes e genes supressores tumorais?

Os tropismos de tecidos de células de câncer em metástase – suas tendências em colonizar alguns órgãos, mas não outros – representam uma outra classe de problemas sem solução. Alguns discernimentos têm sido conquistados a partir de avanços substanciais do entendimento de mecanismos detalhados de metástases osteotrópicas, como descrito na Seção 14.10. Entretanto, essa classe de metástases representa uma rara exceção, na qual, em geral, não se sabe quase nada sobre as interações funcionalmente importantes de células de câncer disseminadas com outros tecidos nos quais se fixam e colonizam. Este é o princípio para mudar (Barra lateral 14.13).

A existência de micrometástases representa o principal desafio para clínicos que gostariam de impedir recidiva da doença anos depois que o tumor primário tenha sido eliminado. Micrometástases menores de 0,2 mm de diâmetro poderiam carregar de várias centenas a milhares de células, e sua detecção em um organismo carregando cerca de 5×10^{13} células representa uma tarefa assustadora. Sem erradicação, essas micrometástases

Barra lateral 14.13 Alguns genes expressos dentro de células tumorais facilitam tipos específicos de metástases Uma estratégia para descobrir genes e proteínas responsáveis por tropismos específicos de órgãos envolve o isolamento de células tumorais que mostram preferência por colonizar um órgão-alvo, mas não outro. Resgatando células metastáticas resultantes de um dado órgão, propagando-as *in vitro* e reinjetando-as no camundongo hospedeiro, seguindo, uma vez mais, o isolamento de células metastáticas desse órgão, é possível selecionar clones de células de câncer que expressam estavelmente um alto tropismo específico por esse órgão.

De maneira alternativa, clones de células únicas (i. e., cada população de célula clonal descende de uma célula isolada) podem ser preparados de uma população heterogênea de células presentes em uma li-

nhagem de células de câncer humana. O perfil da expressão gênica de cada um pode ser analisado, e, independentemente, sua tendência em formar metástase em um ou outro órgão-alvo pode ser determinada. Isso pode levar à identificação de certos genes cuja expressão em uma célula de câncer está correlacionada com tropismo metastático daquela célula e poderia até contribuir naturalmente para seu comportamento (Figura 14.53). De fato, a expressão ectópica de um grupo de tais genes em populações de células clonais que de outro modo seriam pouco metastáticas pode induzir essas células a exibir potentes metástases osteotrópicas. Tais experimentos também indicam que, dentro de uma população de células heterogêneas de tumor, vários padrões de expressão de genes preexistentes podem influenciar células individuais a exibir uma variedade de comportamentos metastáticos.

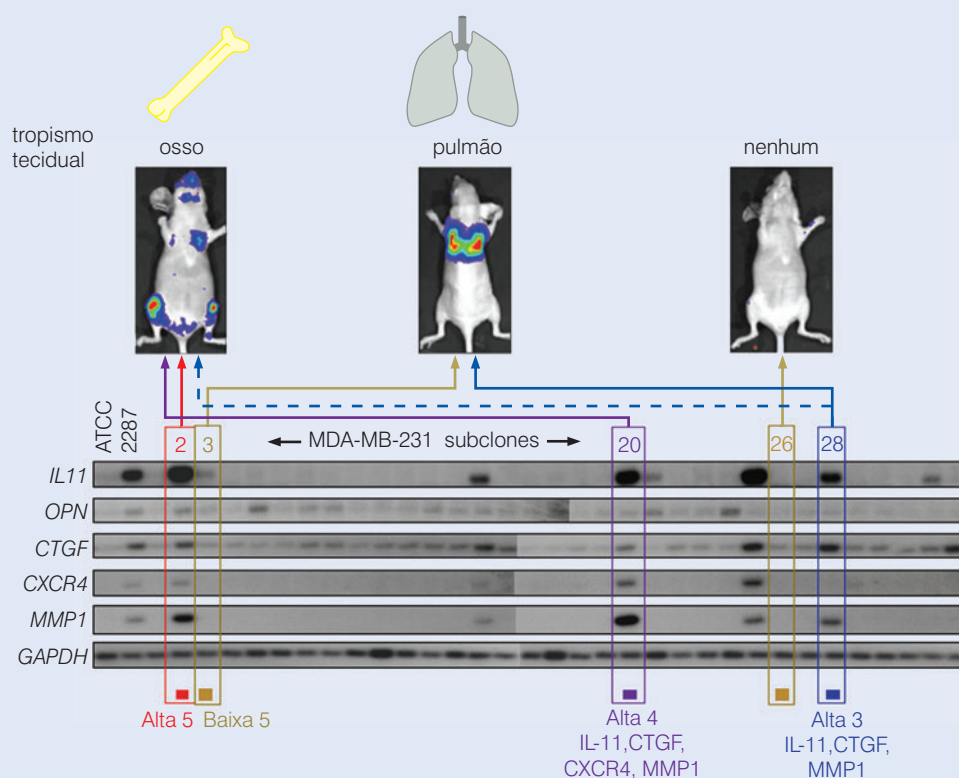


Figura 14.53 Padrões de expressão gênica e tropismo metastático Trinta e três células únicas foram coletadas de uma grande população de células humanas MDA-MB-231 (veja a Figura 14.49), e cada uma foi expandida em uma população clonal em cultura. O padrão de expressão de mRNA de cada subclone foi analisado (colunas, ordenadas da esquerda para a direita) usando-se sondas para mRNAs de uma série de cinco genes – *IL11* (interleucina-11), *OPN* (osteoontina), *CTGF* (fator de crescimento de tecido conetivo), *CXCR4* (receptor 4 de quimiocina) e *MMP1* (metaloproteinase 1 de matriz) – e um sexto mRNA como controle *GAPDH* (gliceraldeído-3- fosfato desidrogenase). Além disso, o padrão de expressão da população de células tumorais original (ATCC, coluna da esquerda) e uma população de células de câncer subclonada chamada 2287 (que foi selecionada por sua habilidade de gerar metástases osteolíticas; segunda coluna) foram analisados. Os cinco genes experimentais foram escolhidos pela sua superexpressão em células metastáticas osteotrópicas e suas propriedades biológicas

conhecidas em promover metástases osteolíticas. Como visto aqui, células do clone 2 (caixa vermelha), quando injetadas na circulação arterial, mostraram uma tendência a produzir metástases osteotrópicas, como indicado por uma imagem *in vivo* de tumores desenvolvidos por estes camundongos; essas células expressaram altos níveis de todos os cinco mRNAs experimentais. Células do clone 3 (caixa amarela), ao contrário, expressaram baixos níveis de todos os cinco mRNAs e preferencialmente formaram metástases no pulmão. E genes do clone 26 (caixa amarela), que expressaram quase nada desses mRNAs, não formaram metástases. Entretanto, quando diferentes células pouco metastáticas foram forçadas a expressar combinações de três desses genes, elas adquiriram a habilidade de formar eficientemente metástases em ossos (não-mostrado), apontando para seu papel causal na formação dessas metástases. Metástases foram visualizadas pela presença do gene da luciferase em células do tumor, que faz com essas células liberem sinais bioluminescentes. (De Y. Kang, P.M. Siegel, W. Shu et al., *Cancer Cell* 3:537-549, 2003.)

representam uma ameaça em curso, pois algumas delas podem irromper, em um futuro imprevisível, em um crescimento letal.

Esse assunto leva diretamente a outro: as terapias usadas para tratar tumores primários podem também ser usadas para tratar suas metástases derivadas? Ou as células metastáticas são tão diferentes de seus progenitores no tumor primário que precisam de suas próprias terapias? De fato, a análise do arranjo de expressão indicando substancial similaridade entre o perfil de expressão gênica do tumor primário e seu desdobramento (veja a Figura 14.52) fornece alguma esperança. Foi observado que tais similaridades tornaram plausível que células metastáticas freqüentemente responderão a algumas terapias que tiveram sucesso em atacar e destruir tumores primários dos quais derivaram.

Um profundo entendimento desses processos que levam à formação de metástases é, com certeza, crítico para o desenvolvimento futuro de curas para o câncer. Pelo momento, entretanto, as questões e assuntos não-resolvidos listados anteriormente nos dão uma pausa, pois mostram o quão pouco se sabe sobre os detalhes da cascata metastática e por que, aos olhos de muitos, invasão e metástase representam o principal desafio remanescente da pesquisa básica de câncer.

Por fim, voltamos para o começo deste capítulo: se, como mostram mais e mais as evidências experimentais, a transição epitelial-mesenquimal é um evento crítico na aquisição de invasividade, e se células de câncer ressuscitam fatores de transcrição embrionários para adquirir essas características, então o enunciado de Lewis Wolpert poderia requerer revisão, na qual gastrulação e EMT associadas poderiam ser consideradas alguns dos eventos mais *perigosos* em nossas vidas!

Conceitos-chave

- Invasão e metástase são responsáveis por 90% de mortalidade associada a câncer, e a maioria das células de câncer no momento da morte poderia freqüentemente ser encontrada em metástase em vez de como tumor primário.
- A cascata invasão-metástase envolve invasão local, intravasação, transporte, extravasação, formação de micrometástases e colonização.
- A seqüência de passos nessa cascata é completada apenas com pouca freqüência, resultando em ineficiência metastática. A mínima eficiência desses passos parece ser a colonização.
- Muitos desses passos podem ser executados por células de carcinoma que ativam o programa de biologia celular chamado de transição epitelial-mesenquimal (EMT), que é normalmente usada por células em embriogênese inicial e durante a cicatrização de feridas.
- EMT pode ser programada por fatores de transcrição que agem pleiotropicamente que em geral estão envolvidos em vários passos da embriogênese inicial.
- Sinais liberados pelo microambiente estromal de uma célula cancerosa, operando junto com alterações genéticas e epigenéticas do genoma de células de câncer, são freqüentemente responsáveis pela indução da expressão de fatores de transcrição indutores de EMT nas células de câncer e, assim, são responsáveis também pela indução da EMT.
- EMT envolve perda de um programa de expressão de genes da célula epitelial e aquisição da expressão de genes mesenquimais. Os últimos permitem à célula a adquirir invasividade e mobilidade.
- Mobilidade celular é regulada por uma série de pequenas proteínas G da família Rho que são ativadas por vias de sinais de transdução citoplasmática e controle da montagem do citoesqueleto de actina.
- Invasividade celular é controlada em grande parte por várias metaloproteinases (MMPs) que funcionam degradando componentes da matriz extracelular. Essas enzimas são freqüentemente produzidas por células dentro do estroma associado ao tumor.
- Células de câncer metastáticas podem viajar pelos ductos da linfa até os nódulos. Entretanto, seu espalhamento via circulação do sangue é responsável pela grande maioria de metástases distantes.

- Muitas células de câncer que são carregadas na circulação formam microtrombos alojados nas arteríolas e capilares de vários tecidos.
- A habilidade de células de câncer em extravasar pode depender muito das mesmas atividades que foram usadas inicialmente para executar invasividade e intravasação.
- Enquanto a grande maioria dos passos iniciais da cascata invasão-metástase são provavelmente similares em vários tipos de tumores humanos, o último passo – colonização – provavelmente depende de interações complexas entre vários tipos de células em metástase e microambientes do tecido hospedeiro no qual elas chegaram.
- Os detalhes da colonização são bem-entendidos apenas no contexto de metástase osteotrópica, especialmente metástases osteolíticas iniciadas por células de câncer de mama.
- Em alguns casos, tropismos metastáticos de células de câncer podem ser explicados pela organização da circulação entre o local do tumor primário e o sítio-alvo da metástase. Entretanto, em muitos outros casos, as razões pelas quais células de câncer fazem metástase de tumores primários para certos órgãos-alvo são pouco entendidas.
- A aquisição de forças invasivas e metastáticas parece não envolver mudanças importantes no genótipo de células de câncer dentro do tumor primário.

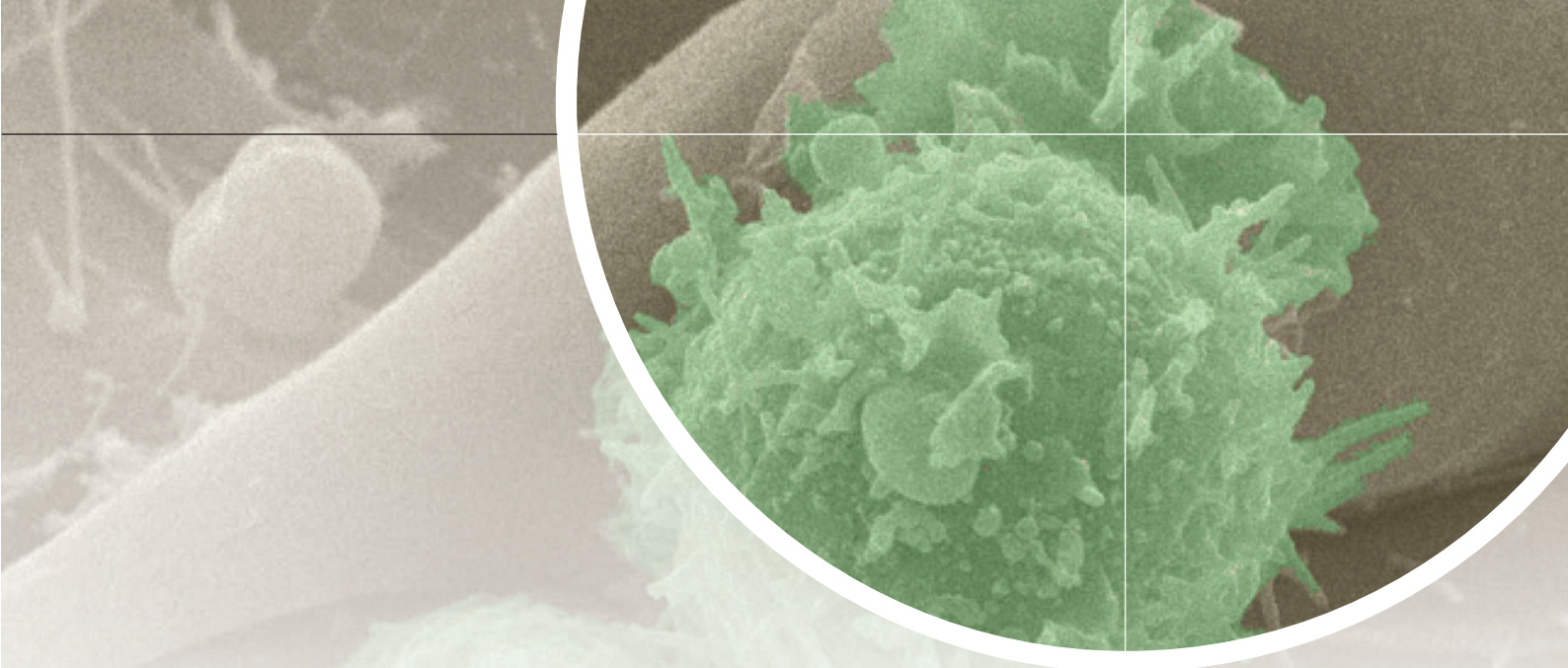
Questões elaboradas

1. Quais argumentos podem ser reunidos contra ou a favor da idéia de que invasão e metástase são provavelmente orquestradas por alelos mutantes específicos que são adquiridos por células de câncer tarde na progressão tumoral?
2. Que explicações podem ser propostas para a ineficiência da colonização pelas células dentro de micrometástases?
3. Quais argumentos sugerem que a habilidade em fazer metástase é expressa ou pela massa de células de câncer no tumor primário ou apenas pela minoria de células que são especializadas em fazê-la?
4. Que evidência sugere que a evolução genética e epigenética de células de câncer pode ocorrer em locais dentro do corpo que há muito foram removidos do tumor primário?
5. Que tipos específicos de suporte fisiológico poderiam ser fornecidos por tecidos que estão freqüentemente em locais de metástases de células de câncer bem-sucedidas? De que maneira esses suportes afetam o sucesso final do procedimento de colonização?
6. Como tumores primários poderiam exibir forças metastáticas tão logo eles tenham se formado?
7. Como a habilidade de impedir metástases têm efeitos demonstráveis no curso clínico de alguns tumores humanos, mas não em outros?
8. Que evidências apóiam o envolvimento da EMT em patogênese de tumores humanos e que evidências apontam contra a EMT?
9. Como poderia a habilidade de determinar exatamente o prognóstico de um tumor de próstata ou de mama diagnosticado levar a mudanças dramáticas na prática da clínica oncológica?

Leitura adicional

- Akhurst RJ & Balmain A (1999) Genetic events and the role of TGF- β in epithelial tumor progression. *J. Pathol.* 187, 82–90.
- Barrallo-Gimeno A & Nieto MA (2005) The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer. *Development* 132,3151–3161.
- Birchmeier C, Birchmeier W, Gherardi E & Vande Woude GF (2003) Met, metastasis, motility and more. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 915–925.
- Blasi F & Carmeliet P (2002) uPAR: a versatile signalling orchestrator. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 932–943.
- Brabietz B, Jung A, Spaderna S et al., (2005) Migrating cancer stem cells—an integrated concept of malignant tumour progression. *Nat. Rev. Cancer* 5,744–749.
- Braun S, Pantel K, Muller P et al. (2000) Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with Stage I, II or III breast cancer. *N. Engl. J. Med.* 342, 525–533.
- Brinkerhoff CD & Matrisian LM (2002) Matrix metalloproteinases: a tall of a frog that became a prince. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 207–214.
- Bray D (2002) Cell Movements. New York: Garland Science.
- Burridge K & Wennerberg K (2004) Rho and Rac take center stage. *Cell* 116, 167–179.
- Cavallaro U & Christofori G (2001) Cell adhesion in tumor invasion and metastasis: loss of the glue is not enough. *Biochim. Biophys. Acta/Rev. Cancer* 1552, 39–45.
- Cavallaro U & Christofori G (2004) Cell adhesion and signaling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 4, 118–132.
- Chambers AF, Groom AC & MacDonald IC (2002) Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat. Rev. Cancer* 2, 563–572.
- Comoglio PM & Trusolino L (2002) Invasive growth: from development to metastasis. *J. Clin. Invest.* 109, 857–862.

- Condeelis JS (2001) Lamellipodia in invasion. *Semin. Cancer Biol.* 11, 119–128.
- Conway EM & Carmeliet P (2003) Cardiovascular biology: signalling silenced. *Nature* 425, 139–141.
- Coussens LM, Fingleton B & Matrisian LM (2002) Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations. *Science* 295, 2387–2393.
- Coussens L & Werb Z (2002) Inflammation and cancer. *Nature* 420, 860–867.
- deCaestecker MP, Piek E & Roberts AB (2000) Role of transforming growth factor-beta signaling in cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 92, 1388–1402.
- Derynck R, Akhurst RJ & Balmain A (2001) TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nat. Genet.* 29, 117–129.
- Egeblad M & Werb Z (2002) New functions for the matrix metalloproteinase in cancer progression. *Nat. Rev. Cancer* 2, 161–174.
- Feldner J & Brandt BH (2002) Cancer cell motility—on the road from c-erbB-2 receptor steered signaling to actin reorganization. *Exp. Cell Res.* 272, 93–108.
- Fidler IJ (2001) in *Cancer: Principles and Practice of Oncology* (V.T. DeVita, jr., S. Hellman, SA Rosenberg eds), pp 135–152. Philadelphia: Lippincott-Raven.
- Fidler IJ (2001) Seed and soil revisited: contribution of the organ microenvironment to cancer metastasis. *Cancer Metastasis: Biol. Clin. Aspects* 10, 257–269.
- Fidler IJ (2003) The pathogenesis of cancer metastasis: the “seed and soil” hypothesis revisited. *Nat. Rev. Cancer* 3, 453–458.
- Hay ED (2005) The mesenchymal cell, its role in the embryo, and the remarkable signaling mechanisms that create it. *Dev Dynamics* 3, 706–720.
- Jaffe AB & Hall A (2002) Rho GTPases in transformation and metastasis. *Adv Cancer Res.* 84, 57–80.
- Jechlinger M, Grünert S & Beug H (2003) Mechanisms in epithelial plasticity and metastasis: insights from 3D cultures and expression profiling. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 7, 415–432.
- Karkkainen MJ, Mäkinen T & Alitalo K (2002) Lymphatic endothelium: a new frontier of metastasis research. *Nat. Cell Biol.* 4, E2–E5.
- Karpanen T & Alitalo K (2001) Lymphatic vessels as targets of tumor therapy? *J. Exp. Med.* 194, F37–F42.
- Klein CA (2003) The systemic progression of human cancer: a focus on the individual disseminated cancer cell—the unit of selection. *Adv. Cancer Res.* 89, 35–67.
- Linder S & Aepfelbacher M (2003) Podosomes: adhesion hot-spots of invasive cells. *Trends Cell Biol.* 13, 376–385.
- MacDonald IC, Groom AC & Chambers AF (2002) Cancer spread and micrometastasis development: quantitative approaches for in vivo models. *Bioessays* 24, 885–893.
- Mareel M & Leroy A (2003) Clinical, cellular, and molecular aspects of cancer invasion. *Physiol. Rev.* 83, 337–376.
- Mundy GR (2002) Metastasis to bone: causes, consequences, and therapeutic opportunities. *Nat. Rev. Cancer* 2, 584–593.
- Murphy PM (2001) Chemokines and the molecular basis of cancer metastasis. *N. Engl. J. Med.* 345, 833–835.
- Nieto MA (2002) The Snail superfamily of zinc-finger transcription factors. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 155–166.
- Overall CM & Lopez-Otin C (2002) Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era. *Nat. Rev. Cancer* 2, 657–672.
- Paget S (1889) The distribution of secondary growths in cancer of the breast (republication of 1889 Lancet article). *Cancer Metast. Rev.* 8, 98–101.
- Pollard JW (2004) Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat. Rev. Cancer* 4, 71–78.
- Pollard TD & Borisy GG (2003) Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* 112, 453–465.
- Ridley A (2000) Cancer: molecular switches in metastasis. *Nature* 406, 466–467.
- Ridley AJ (2001) Rho family proteins: coordinating cell responses. *Trends Cell Biol.* 11, 471–477.
- Ridley AJ (2001) Rho GTPases and cell migration. *J. Cell Sci.* 114, 2713–2722.
- Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K et al. (2003) Cell migration: integrating signals from front to back. *Science* 302, 1704–1709.
- Riethmüller G & Klein CA (2001) Early cancer cell dissemination and late metastatic relapse: clinical reflections and biological approaches to the dormancy problem in patients. *Semin. Cancer Biol.* 11, 307–311.
- Rosário M & Birchmeier W (2003) How to make tubes: signaling by the Met receptor tyrosine kinase. *Trends Cell Biol.* 13, 328–335.
- Rossi D & Zlotnik A (2000) The biology of chemokines and their receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 18, 217–242.
- Sahai E & Marshall CJ (2002) RHO-GTPases and cancer. *Nat. Rev. Cancer* 2, 133–142.
- Savagner P (2001) Leaving the neighborhood: molecular mechanisms involved during epithelial-mesenchymal transition. *Bioessays* 23, 912–923.
- Schmidt A & Hall A (2002) Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. *Genes Dev.* 13, 1587–1609.
- Shevde LA & Welch DR (2003) Metastasis suppressor pathways—an evolving paradigm. *Cancer Lett.* 198, 1–20.
- Siegel PM & Massagué J (2003) Cytostatic and apoptotic actions of TGF- β in homeostasis and cancer. *Nat. Rev. Cancer* 3, 807–820.
- Stacker SA, Achen MG, Jussila L et al. (2002) Lymphangiogenesis and cancer metastasis. *Nat. Rev. Cancer* 2, 573–583.
- Steeg PS (2003) Metastasis suppressors alter the signal transduction of cancer cells. *Nat. Rev. Cancer* 3, 55–63.
- Thiery JP (2002) Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat. Rev. Cancer* 2, 442–454.
- Thiery JP (2003) Epithelial-mesenchymal transitions in development and pathologies. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15, 740–746.
- Vernon AE & LaBonne C (2004) Tumor metastasis: a new twist on epithelial-mesenchymal transitions. *Curr Biol.* 14, R719–R721.
- Wakefield LM & Roberts AB (2002) TGF- β signaling: positive and negative effects on tumorigenesis. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12, 22–29.
- Weigelt B, Peterse JL & van't Veer LJ (2005) Breast cancer metastasis: markers and models. *Nat. Rev. Cancer* 5, 591–602.
- Weiss L (1990) Metastatic inefficiency. *Adv. Cancer Res.* 54, 159–211.
- Yoshida BA, Sokoloff MM, Welch DR, & Rinker-Schaeffer CW (2000) Metastasis-suppressor genes: a review and perspective on an emerging field. *J. Natl. Cancer Inst.* 92, 1717–1730.



CAPÍTULO 15

Controle Populacional: Imunologia Tumoral e Imunoterapia

“Não é totalmente inconcebível que pequenos acúmulos de células tumorais possam se desenvolver e, por causa da presença de novas potencialidades antigênicas, provoquem uma resposta imune efetiva com a regressão do tumor e nenhum sinal clínico da sua existência.”

Macfarlane Burnet, imunologista, 1957

Este capítulo apresenta uma visão de como as defesas do hospedeiro são ativadas durante o crescimento tumoral. Muitos dos mecanismos de defesa são inerentes às células, fazendo parte de um circuito finamente controlado. Dentre os vários mecanismos, o mais importante envolve a ativação de vias apoptóticas responsáveis pela morte de células que apresentam defeitos estruturais e/ou fisiológicos. Ademais, o circuito pRb e o sistema de reparo de DNA são igualmente relevantes para a eliminação de células tumorais incipientes.

A organização tecidual também constitui um determinante para a proliferação celular nas fases precoces do desenvolvimento tumoral. Por exemplo, células epiteliais normais que perdem a ligação à membrana basal, ativam uma forma apoptótica denominada *anoikis* (perda de adesão). Esse mecanismo limita a capacidade de tais células de proliferarem em sítios ectópicos (i. e., anormais). Da mesma forma, aspectos particulares das células-tronco e seu genoma (Seção 12.3) também reduzem a probabilidade de células tumorais se estabelecerem em um dado tecido.

Em adição a esses mecanismos célula e tecido-específicos, os mamíferos ainda possuem uma outra linha de defesa importante – o sistema imune. Esse sistema é altamente especializado na detecção e eliminação de agentes infecciosos, incluindo vírus, bactérias e fungos. Uma das maiores questões estudadas na última metade do século passado é de como o sistema imune também poderia ser capaz de fazer o reconhecimento e de eliminar células tumorais.

De fato, existem diversas evidências indicando que o sistema imune pode contribuir muito para as defesas contra o câncer. As dificuldades associadas a esse tipo de defesa parecem óbvias: o sistema imune é organizado de forma a reconhecer e eliminar agentes estranhos ao organismo, sem, no entanto, interferir em componentes do hospedeiro. Entretanto, as células tumorais são nativas ao organismo e, em muitos casos, indistinguíveis das células normais. Assim, resta a dúvida de como essas células seriam reconhecidas como estranhas pelo sistema imune, tornando-se alvos dos mecanismos de defesa do organismo. Essa e outras questões relacionadas serão extensivamente discutidas ao longo deste capítulo.

O campo da imunologia tumoral, mais do que qualquer outra área de estudo do câncer, ainda permanece com muitos conceitos básicos a serem definidos. Conseqüentemente, muitas das observações e conclusões apresentadas neste capítulo têm um caráter didático e estão, sem dúvida, sujeitas a alterações em um futuro próximo. No entanto, esta área da biologia do câncer não pode ser desconsiderada, uma vez que representa uma grande promessa para a melhor compreensão dos mecanismos envolvidos nas neoplasias e para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

Pesquisas realizadas com mamíferos nas três últimas décadas revelaram que o sistema imune apresenta uma grande complexidade de ações. Antes de iniciar as considerações acerca das funções antitumorais do sistema imune, torna-se necessário fazer uma revisão das funções gerais do sistema imune. Uma compreensão dos mecanismos de ação, ainda que superficialmente, é um pré-requisito para responder às três principais questões levantadas neste capítulo. Primeiramente, quais mecanismos celulares e moleculares permitem que o sistema imune seja capaz de reconhecer e atacar células tumorais? Segundo, seriam de fato esses mecanismos eficazes na prevenção do aparecimento de tumores? E, finalmente, como o sistema imune poderia ser mobilizado e/ou ativado em situações clínicas nas quais o tumor já se encontra formado? (Uma introdução sobre imunologia será apresentada entre as seções 15.1 e 15.6; uma revisão será apresentada na Figura 15.14.)

15.1 O sistema imune funciona de maneiras complexas para destruir agentes estranhos invasores e células anormais nos tecidos do corpo

O sistema imune apresenta uma série de mecanismos responsáveis pela eliminação de agentes infecciosos ou células do organismo que estejam infectadas. A ativação desses mecanismos está relacionada ao reconhecimento de **antígenos**. O sistema imune é ativado a fim de **neutralizar** ou destruir agentes infecciosos (células bacterianas e fúngicas ou partículas virais), bem como células infectadas que apresentam esses antígenos. Em relação às defesas imunes contra o câncer, acredita-se que mecanismos semelhantes àqueles ativados no combate aos processos infecciosos sejam estimulados.

Dentre as estratégias de defesa mais conhecidas está a **resposta imune humoral** – a parte do sistema imune que gera **anticorpos** solúveis capazes de reconhecer e ligar antígenos de forma específica (Figura 15.1). Assim, partículas virais ou bactérias que apresentam antígenos de superfície podem ser rapidamente neutralizadas pela ligação a anticorpos (Figura 15.2). Similarmente, uma célula infectada pode apresentar em sua superfície antígenos produzidos pelo agente da infecção, tornando-se também alvo de ligação para os anticorpos. Uma vez que uma célula infectada ou um agente infeccioso são ligados a

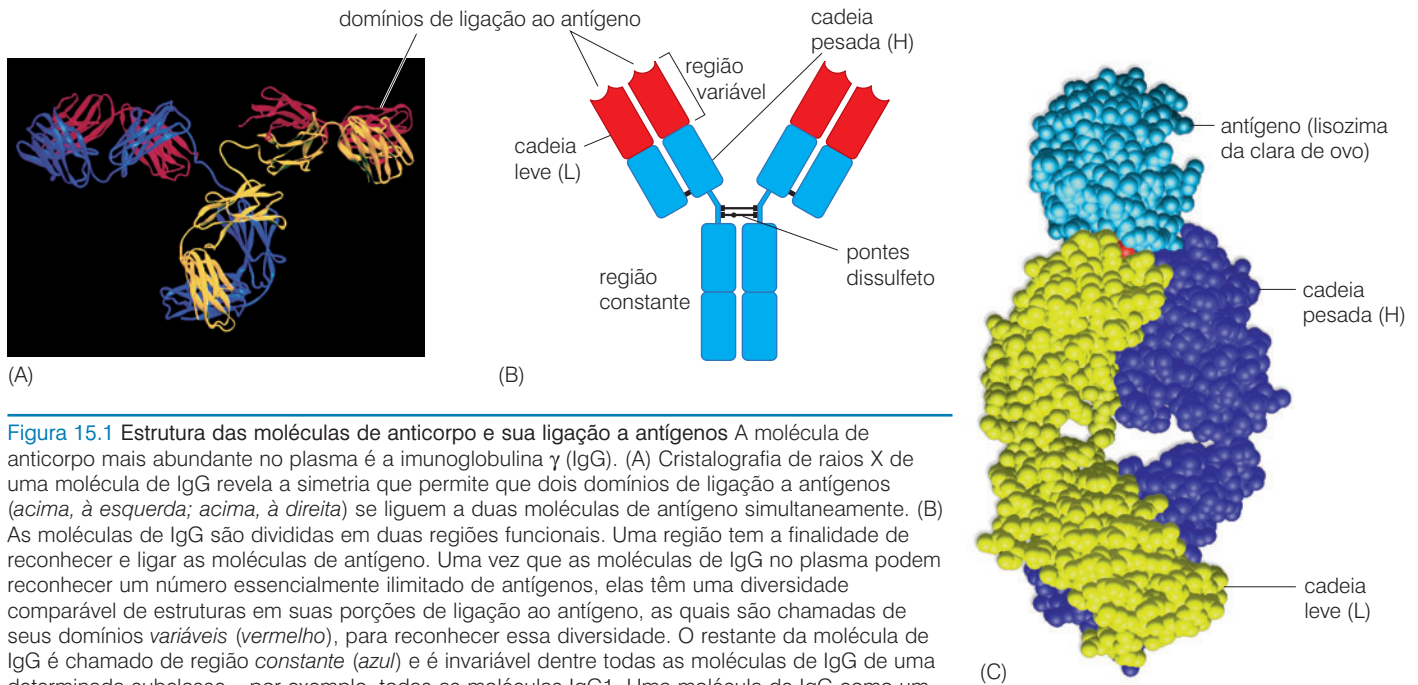


Figura 15.1 Estrutura das moléculas de anticorpo e sua ligação a antígenos. A molécula de anticorpo mais abundante no plasma é a imunoglobulina γ (IgG). (A) Cristalografia de raios X de uma molécula de IgG revela a simetria que permite que dois domínios de ligação a antígenos (*acima, à esquerda; acima, à direita*) se liguem a duas moléculas de antígeno simultaneamente. (B) As moléculas de IgG são divididas em duas regiões funcionais. Uma região tem a finalidade de reconhecer e ligar as moléculas de antígeno. Uma vez que as moléculas de IgG no plasma podem reconhecer um número essencialmente ilimitado de antígenos, elas têm uma diversidade comparável de estruturas em suas porções de ligação ao antígeno, as quais são chamadas de seus domínios *variáveis* (*vermelho*), para reconhecer essa diversidade. O restante da molécula de IgG é chamado de região *constante* (*azul*) e é invariável dentre todas as moléculas de IgG de uma determinada subclasse – por exemplo, todas as moléculas IgG1. Uma molécula de IgG como um todo é um heterotetrâmero composto por duas cadeias leves (L) e duas cadeias pesadas (H). Dois bolsos separados de reconhecimento e de ligação ao antígeno são expressos (*acima, à esquerda; acima, à direita*) cada um composto por um domínio N-terminal de uma cadeia L e de uma cadeia H (*formas côncavas*). (C) A estrutura detalhada de um complexo antígeno-anticorpo é vista aqui neste modelo molecular espacial no qual os domínios de ligação do anticorpo da cadeia pesada (*violeta*) e da cadeia leve (*amarelo*) são observados fazendo contato com a molécula antigênica – neste caso, a molécula lisozima da clara de ovo (*azul-claro*). Apenas as partes das regiões variáveis das cadeias pesada e leve são mostradas aqui. (Um resíduo de glutamina, *vermelho*, é indicado como importante para a ligação mediada pelo hidrogênio do antígeno à molécula de anticorpo.) (Extraída de C.A. Janeway Jr. et al., Immunobiology, 6th Ed., New York: Garland Science, 2005).*

um anticorpo, podem ser reconhecidos, fagocitados e destruídos por células competentes, como macrófagos. Podem ainda ser eliminados por células citotóxicas, como as células matadoras naturais (NK) (Figura 15.3). Deve-se destacar que as células imunes

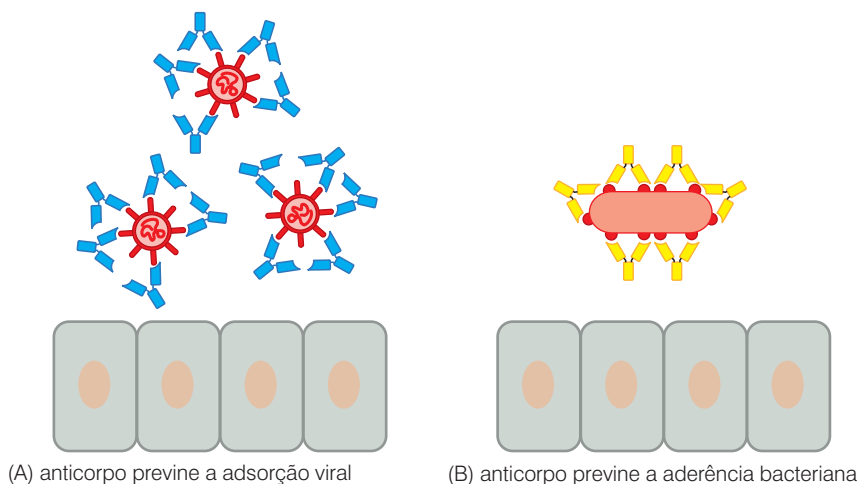


Figura 15.2 Neutralização por moléculas de anticorpo. (A) Partículas virais (*vermelho*) podem se tornar marcadas por moléculas de anticorpo (*azul*) produzidas pelo sistema imune do hospedeiro infectado. Essa ligação neutraliza (inativa) a infectividade das partículas por bloquear a sua adsorção às células do hospedeiro. (B) Similarmente, uma bactéria expressando certos antígenos de superfície (*vermelho*) pode também ser impedida de aderir às células do hospedeiro pela ligação a moléculas de anticorpo.

* Publicado, em português, pela Artmed Editora, com o título *Imunobiologia: O Sistema Imune na Saúde e na Doença*, em 2006.

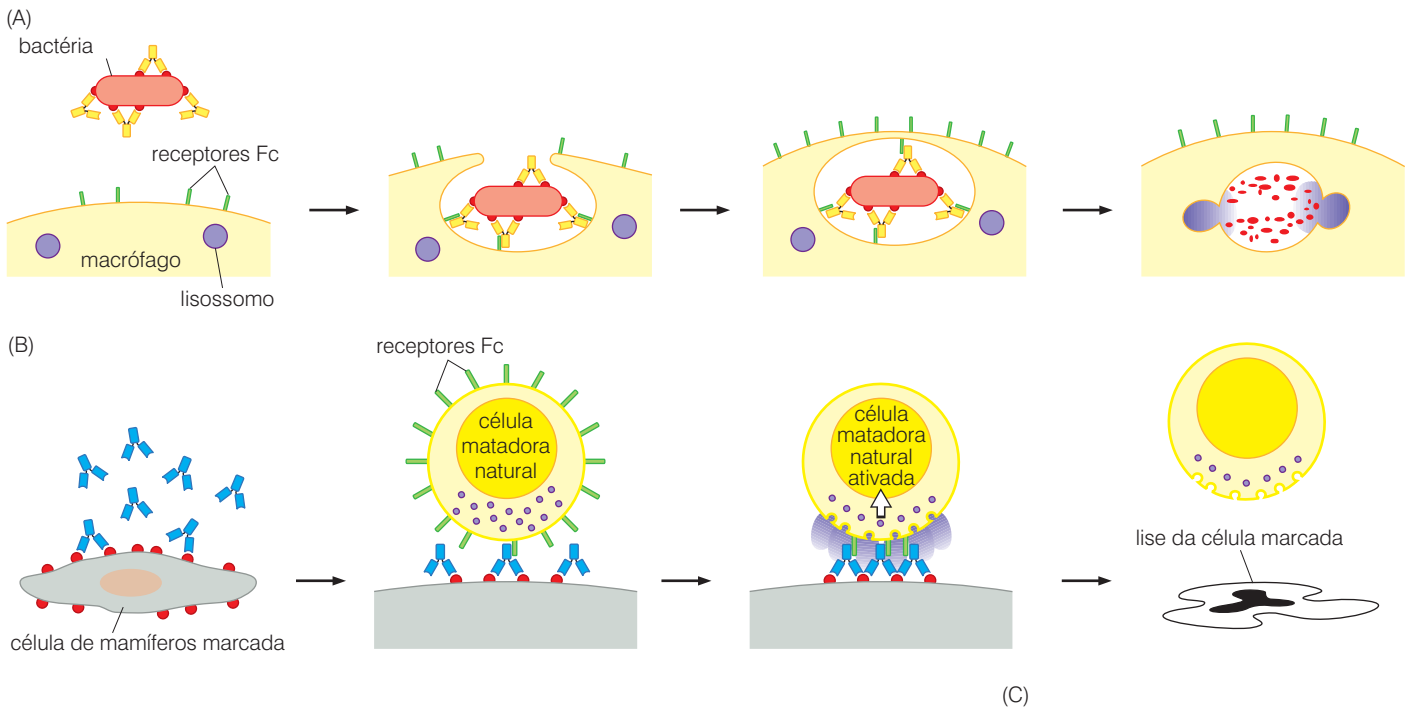


Figura 15.3 Marcação de patógenos por moléculas de anticorpo e sua eliminação por células efectoras do sistema imune. A marcação de vírus, bactérias e células de mamíferos por moléculas de anticorpo é frequentemente um sinal para que elas sejam fagocitadas (englobadas) ou destruídas pelas células citotóxicas do sistema imune. (A) A ligação de uma bactéria (vermelha) por moléculas de anticorpo (amarelo) pode induzir um macrófago a utilizar receptores especializados sobre sua superfície, chamados de receptores Fc (verde), para reconhecer e ligar às regiões constantes das moléculas de anticorpo (as quais não estão envolvidas no reconhecimento de antígenos; veja a Figura 15.1). Isso frequentemente resulta na fagocitose da bactéria ligada ao anticorpo e sua eventual destruição nos lisossomos dentro do citoplasma do macrófago. (B) Uma célula de mamíferos (cinza) se torna marcada por moléculas de anticorpo (azul) que reconhecem e ligam antígenos (vermelho) sobre sua superfície. Um tipo de linfócito chamado de célula matadora natural (NK) usa, então, seus receptores Fc de superfície (verde) para ligar as regiões constantes das moléculas de anticorpo. Essa ligação resulta na inativação das células matadoras naturais, as quais iniciam a destruição da célula-alvo, utilizando grânulos citotóxicos (pontos violeta) cujos conteúdos são injetados nas células-alvo para tal fim. (C) Hemácias de ovelha foram tratadas com um anticorpo que reconhece um antígeno expresso na sua superfície. Como observado nesta micrografia eletrônica de varredura, um grande número delas foi absorvida por um macrófago por meio de receptores Fc de sua superfície. (A e B extraídas de C.A. Janeway Jr. et al., *Immunobiology*, 6th Ed., New York: Garland Science, 2005; C obtido de J. Swanson, Universidade de Michigan.)



não possuem, *per se*, a capacidade de reconhecer antígenos específicos em agentes estranhos ao organismo. Assim, os anticorpos ligados a antígenos na superfície de vírus, bactérias ou células do hospedeiro é que sinalizam às células do sistema imune acerca de quais alvos devem ser destruídos.

Outra parte fundamental do sistema imune envolve a **resposta imune celular**. Esse tipo de resposta é ativado quando células citotóxicas especializadas são desenvolvidas, adquirindo a capacidade de reconhecer e atacar outras células que apresentam antígenos em sua superfície. Nesse caso, anticorpos solúveis não são necessários como intermediários do processo, já que células citotóxicas da linhagem linfocitária T (CTLs) apresentam mecanismos próprios de reconhecimento antigênico na forma de receptores de células T (TCRs). Esses receptores são responsáveis pela identificação de células que apresentam antígenos específicos tornando-as alvos de linfócitos T citotóxicos (Figura 15.4).

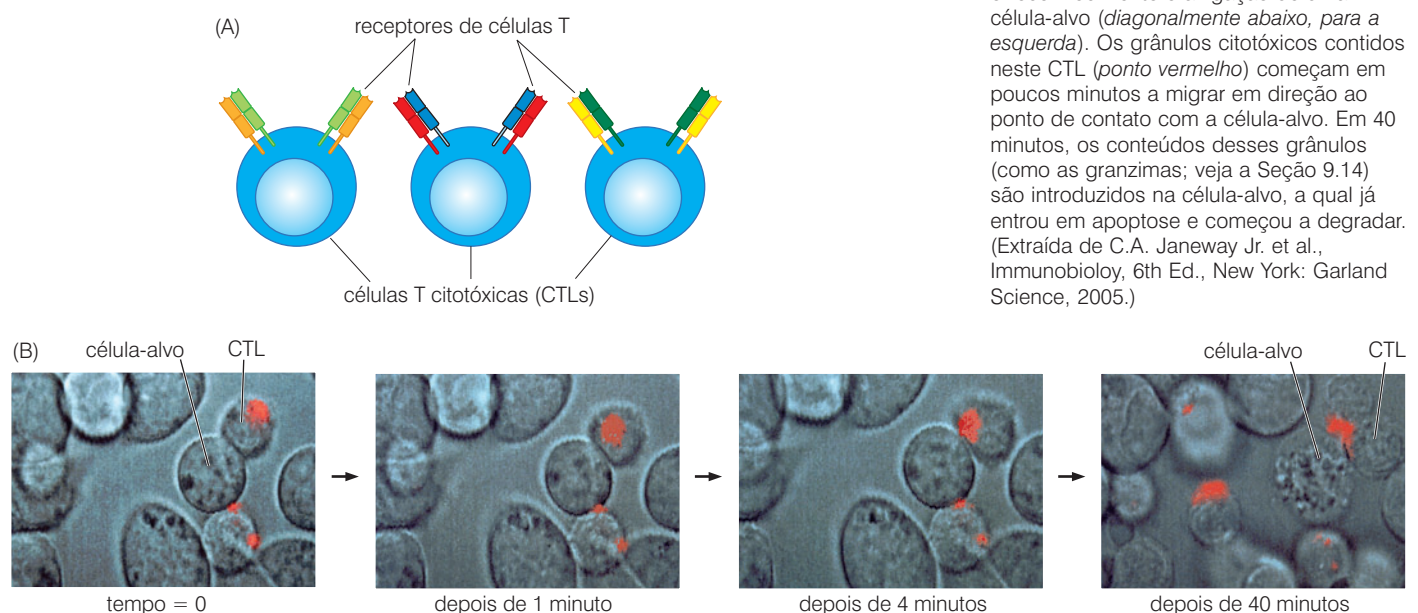
O sistema imune também pode ser ilustrado de uma outra forma: muitas das respostas imunológicas a um agente infeccioso (p. ex., uma cepa específica de um vírus) e seus antígenos dependem de um contato prévio com tal agente. O sistema imune possui a capacidade de reconhecer certos antígenos apresentados por agentes infecciosos, formando mecanismos de defesa que serão ativados na eminência de uma nova exposição a esses antígenos; essa é a base da **resposta imune adaptativa**. Ao mesmo tempo, outros componentes celulares do sistema imune são naturalmente habilitados ao reconhecimento de certos agentes infecciosos ou células anormais, sem que haja a necessidade de uma exposição prévia e de mecanismos adaptativos. Essa propriedade está relacionada aos mecanismos da **resposta imune inata**. Por exemplo, as células matadoras naturais (NK), citadas anteriormente, são capazes de reconhecer moléculas de superfície específicas expressas por células com padrões anormais, mesmo sem ter havido um contato prévio.

15.2 A resposta imune adaptativa leva à produção de anticorpos

As respostas imunes adaptativas são iniciadas quando partículas infecciosas ou células anormais são fagocitadas por células especializadas do sistema imunológico, notavelmente por macrófagos de **células dendríticas (DCs)** (Figura 15.5). Após a ingestão total ou de fragmentos, as células fagocíticas são encarregadas de apresentar o conteúdo englobado a outros componentes do sistema imune. Mais especificamente, essas células devem informar ao sistema imune acerca do conjunto de antígenos que estejam associados às partículas ingeridas. Esse processo ocorre nos linfonodos, para os quais essas células migram após a fagocitose. (Como discutido em maiores detalhes a seguir, esses antígenos são apresentados, dentro dos linfonodos, a vários tipos de células T.)

Para que ocorram as adaptações necessárias ao sistema imune, essas **células apresentadoras de antígeno (APCs)** inicialmente digerem as partículas que foram fagocitadas (ou seja, ingeridas depois de englobadas) ou que sofreram endocitose (i. e., que foram ligadas por receptores de superfície e então internalizadas). Essa digestão, a qual normalmente é realizada por vesículas citoplasmáticas especializadas, converte as proteínas internalizadas em pequenos oligopeptídeos contendo 18 a 22 aminoácidos. Os oligopeptídeos são então expostos ao **complexo de histocompatibilidade maior (MHC)** de classe II (Figura 15.6). Mais especificamente, os fragmentos oligopeptídicos se ligam a domínios apresentadores de antígeno es-

Figura 15.4 Linfócitos-T citotóxicos O componente celular da resposta imune resulta na formação de células citotóxicas, como células T citotóxicas (T_C 's, CTLs) que são capazes de reconhecer e matar outras células que expressam certos antígenos sobre sua superfície. (A) CTLs desenvolvem moléculas semelhantes a anticorpos sobre sua superfície chamadas de receptores de células T (TCRs). Uma variedade de TCRs são originados durante o desenvolvimento do sistema imune, em paralelo ao desenvolvimento de um vasto repertório de anticorpos solúveis. Cada CTL expressa um TCR de reconhecimento ao antígeno particular. (B) Imagem de um CTL (*acima, à direita, 1ª painél*) que utilizou seu TCR para o reconhecimento e a ligação de uma célula-alvo (*diagonalmente abaixo, para a esquerda*). Os grânulos citotóxicos contidos neste CTL (*ponto vermelho*) começam em poucos minutos a migrar em direção ao ponto de contato com a célula-alvo. Em 40 minutos, os conteúdos desses grânulos (como as granzimas; veja a Seção 9.14) são introduzidos na célula-alvo, a qual já entrou em apoptose e começou a degradar. (Extraída de C.A. Janeway Jr. et al., Immunobiology, 6th Ed., New York: Garland Science, 2005.)



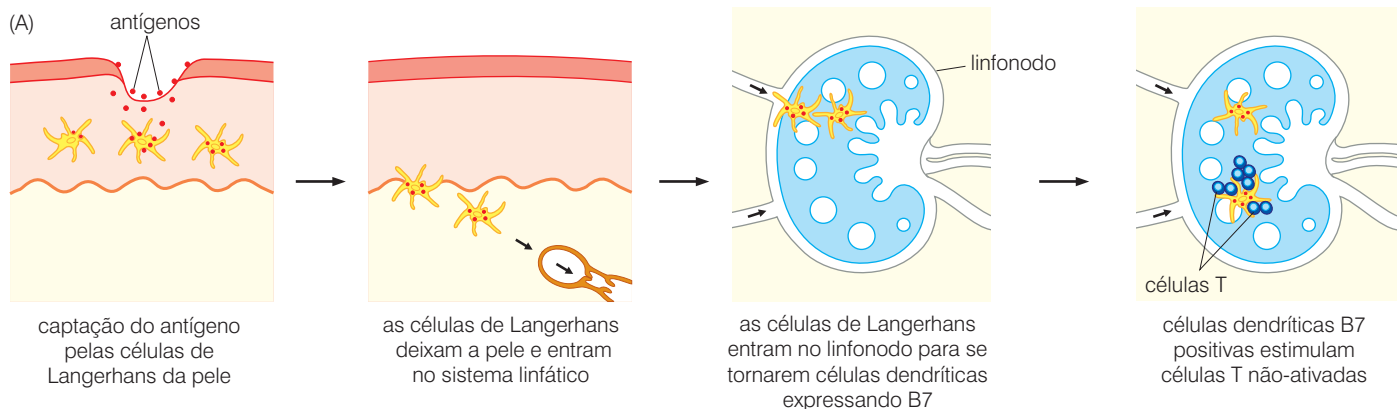
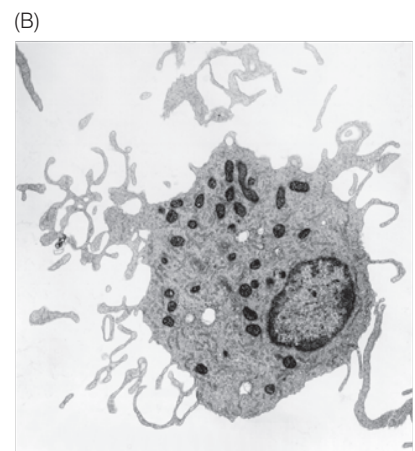


Figura 15.5 Apresentação de antígenos por células dendríticas O sistema imune percebe os agentes infecciosos e seus antígenos por meio das ações das células apresentadoras de antígeno (APCs), notavelmente células dendríticas. (A) Ilustração de células fagocíticas especializadas (i. e., células de Langerhans, *amarelo*) residentes na pele, as quais ingerem os antígenos (*pontos vermelhos*) por fagocitose, migrando para os linfonodos (*azul-claro*), nos quais ocorre a maturação para células dendríticas. Nos linfonodos, essas células confrontam as células T (*círculos azul-escuro*) para as quais são apresentados os antígenos; isso resulta na ativação funcional de células T e na ativação subsequente de uma resposta imune específica contra as células e os vírus que expressam esses antígenos. (B) As células dendríticas têm esse nome em alusão aos vários “braços” que são derivados do corpo celular. (Extraída de C.A. Janeway Jr. et al., *Immunobiology*, 6th Ed., New York: Garland Science, 2005.)



pecializados (Figura 15.7A) de moléculas MHC de classe II. (Em humanos, as moléculas MHC são frequentemente chamadas de HLA – antígenos de leucócitos humanos –, mas o termo MHC será utilizado de forma geral para fazer referência a todas as moléculas dessa classe, tanto de humanos quanto de roedores.)

As moléculas MHC de classe II funcionam com sinalizadores especializados que definem o que é estranho ao organismo, por meio de mecanismos que envolvem os antígenos oligopeptídicos capturados pelas células APCs e algumas células do sistema imune, em especial a classe de linfócitos chamados de células T auxiliares (células- T_H), normalmente referidas

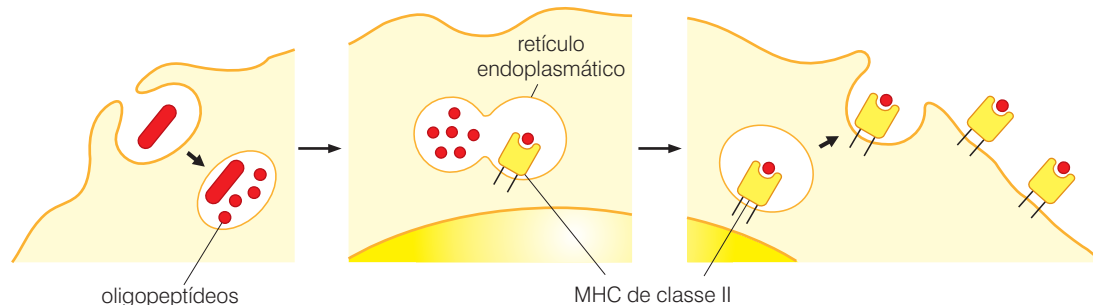


Figura 15.6 Processamento de antígenos por células apresentadoras de antígeno Depois da fagocitose, notavelmente células dendríticas e macrófagos apresentam partículas antigênicas potenciais internalizadas (*bastonetes vermelhos*), as quais são fragmentadas em oligopeptídeos (*pontos vermelhos*) por proteólise. Os oligopeptídeos resultantes são então transportados para as moléculas MHC de classe

II no retículo endoplasmático, as quais se movem para a superfície celular, permitindo que as moléculas MHC de classe II apresentem os fragmentos de oligopeptídeos para as células T nos linfonodos. (Extraída de C.A. Janeway Jr. et al., *Immunobiology*, 6th Ed., New York: Garland Science, 2005.)

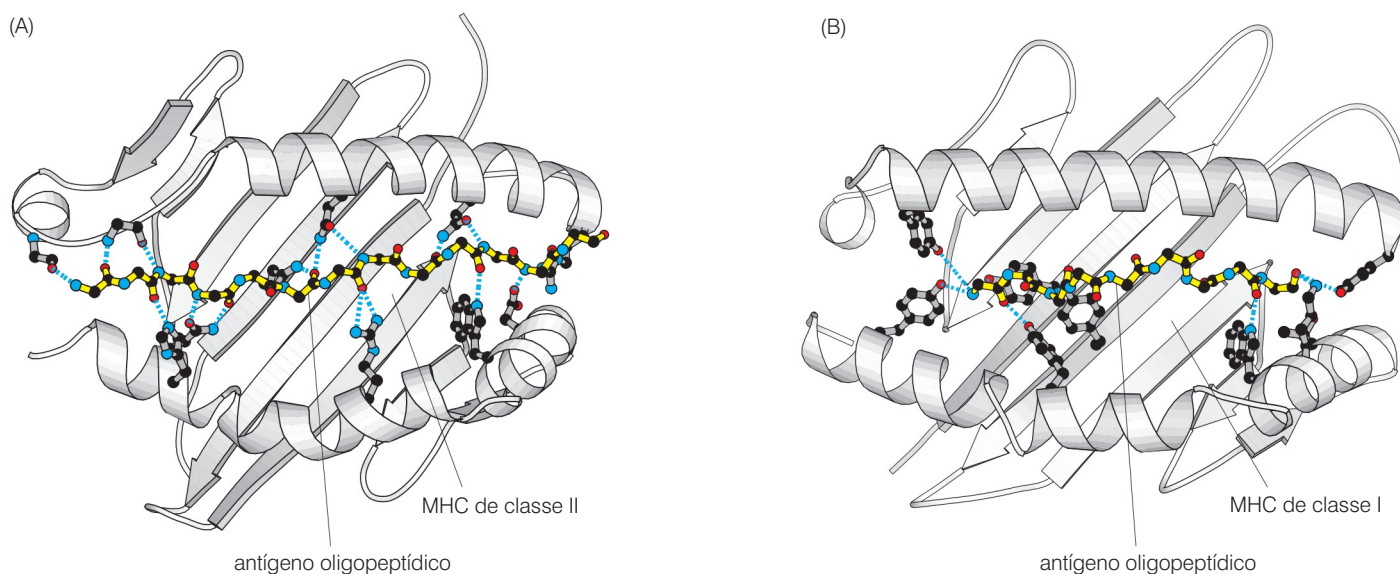


Figura 15.7 Apresentação de antígenos por moléculas MHC (A) A estrutura de um sítio de apresentação de antígenos de uma molécula MHC de classe II é apresentada por cristalografia de raios X. O antígeno oligopeptídico (*figura em bastão, colorida*) que está ligado através de pontes de hidrogênio à "palma" da molécula MHC (*diagrama em fita*) é mostrado com a porção N-terminal à esquerda e a C-terminal à direita. O antígeno oligopeptídico em conjunto com

os resíduos de aminoácidos da molécula MHC forma a estrutura molecular que é reconhecida por outras células imunes, as quais podem, por exemplo, utilizar receptores de células T para tal. (B) Um arranjo bastante similar caracteriza a estrutura do domínio de apresentação de antígeno de moléculas MHC de classe I. (Extraída de C.A. Janeway Jr. et al., *Immunobiology*, 6th Ed., New York: Garland Science, 2005.)

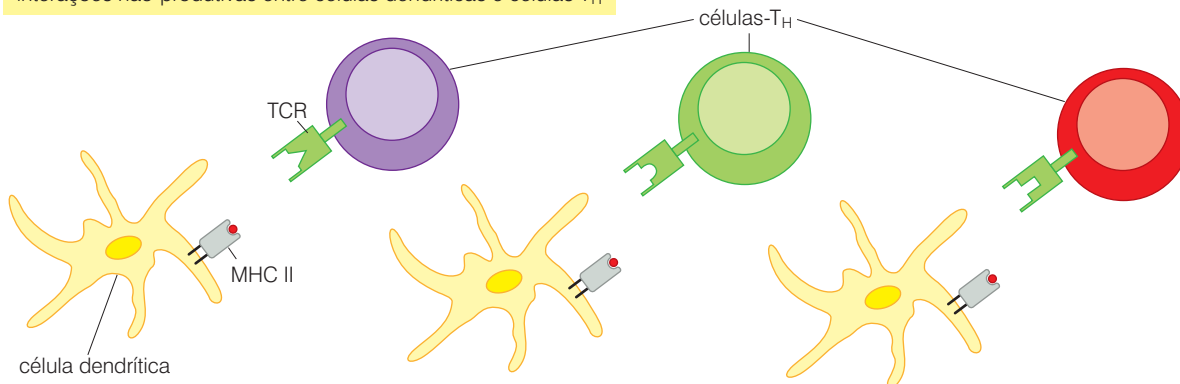
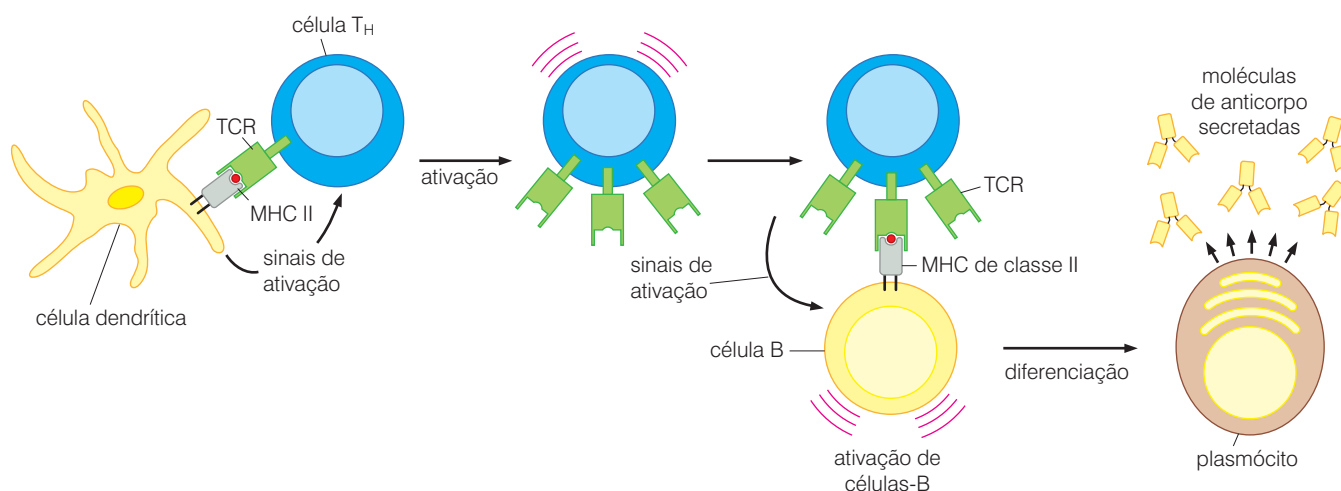
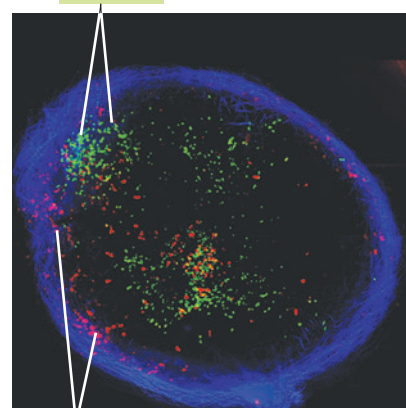
como células $CD4^+$, em alusão aos antígenos de superfície específicos apresentados por elas (Figura 15.8). Uma vez que macrófagos e células dendríticas são especializados em utilizar suas moléculas MHC de classe II para apresentar antígenos que foram fagocitados, os imunologistas comumente as definem como APCs "profissionais", a fim de distingui-las de outros tipos celulares que não são especializados nesse tipo de resposta.

É preciso levar em consideração que é a combinação das estruturas moleculares formadas pelos ectodomínios de classe II e pelos antígenos oligopeptídicos ligados que é apresentada às células T auxiliares (T_H) (Figura 15.7). A apresentação antigênica a determinadas células T leva à conseqüente ativação de células B, que produzem moléculas de imunoglobulina (anticorpos), capazes de reconhecer e ligar de forma específica alguns antígenos (veja a Figura 15.8). A maturação subsequente dessas células B origina uma população de células (chamadas de *plasmócitos*) que secretam ativamente anticorpos na circulação, ou seja, moléculas que são especializadas em reconhecer e ligar os antígenos específicos, que originalmente desencadearam essa série de respostas. (Células dendríticas, desde que com função de APCs, podem também ativar células T citotóxicas – não-indicadas na Figura 15.8.)

Esse sistema funciona bem quando ativado diante de agentes infecciosos, como partículas virais, bactérias e fungos, nos espaços extracelulares. Assim, esses agentes infecciosos podem ser internalizados por células apresentadoras de antígeno profissionais, e os peptídeos derivados podem ser novamente apresentados como antígenos. As moléculas de anticorpo formadas por células B e seus descendentes após a apresentação de antígenos pode reconhecer e ligar as partículas infecciosas, neutralizando-as (veja a Figura 15.2). Dentro da mesma linha, seria possível imaginar que células tumorais que apresentem proteínas antigênicas de superfície possam desencadear a produção de anticorpos pelo sistema imune.

Os anticorpos que marcam uma célula ou um agente infeccioso podem ativar um outro componente das defesas imunológicas: um grupo de proteínas plasmáticas, chamadas de

(A)

interações não-produtivas entre células dendríticas e células T_H interação produtiva entre APC e célula T_H (B) células T_H 

células dendríticas

Figura 15.8 Interação de imunócitos nos linfonodos As células dendríticas interagem diretamente com as células T auxiliares e apresentam os antígenos a elas nos linfonodos. (A) As células dendríticas englobam, processam e apresentam fragmentos oligopeptídicos antigênicos (*pontos vermelhos*; veja a Figura 15.6) expressos em sua superfície às células T dos linfonodos, utilizando moléculas MHC de classe II (*cinza*) para essa função. Aqui, uma célula dendrítica encontra várias células T (*acima*), conhecidas como células T auxiliares (T_H). Cada uma delas expressa seu próprio receptor de célula T distinto (TCR, *verde*) sobre sua superfície. Entretanto, nos três primeiros encontros, nenhum dos receptores de células T das células T_H reconhece e liga o antígeno sendo apresentado pela molécula MHC de classe II da célula dendrítica. De alguma forma, na ocasião correta, a célula dendrítica finalmente reconhece o antígeno oligopeptídico que é apresentado pelas moléculas MHC de classe II das células dendríticas (*abaixo*). Isso faz com que as T_H se tornem ativadas; a célula T_H deixa a célula dendrítica e inicia a busca por células B que também apresentem em sua superfície o mesmo antígeno que a molécula MHC II. Quando e se a T_H encontra uma célula B (*amarelo-claro*, 2º diagrama a partir da direita), esta é ativada e prolifera, se diferenciando em plasmócitos (*marrom-claro*) e liberando as moléculas de anticorpo que são capazes de reconhecer esse antígeno oligopeptídico. (B) A microscopia de multifótons revela a cápsula do linfonodo de um camundongo (*azul*) e várias células dendríticas coradas recém-chegadas (*pontos vermelhos*), bem como células T coradas (*pontos verdes*) para as quais os antígenos serão apresentados pelas células dendríticas. Os dois tipos celulares são bastante separados no outro no linfonodo e seus mecanismos de transporte e interação no linfonodo ainda são pouco compreendidos. As células T_H chegam ao linfonodo pela circulação venosa e extravasam por diapedese (Barra lateral 14.3) a fim de permanecer no nódulo. (B, extraída de T.R. Mempel., S.E. Henrickson e U.H. Von Andrian, *Nature* 427: 154-159, 2004.)

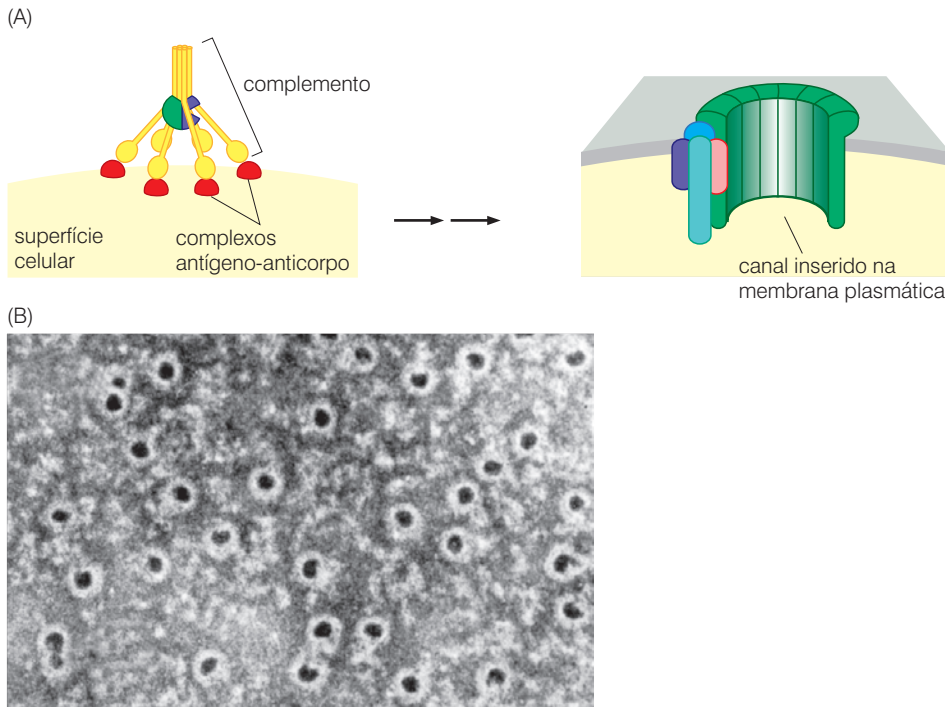


Figura 15.9 Morte celular mediada pelo sistema complemento. Complexos antígeno-anticorpo (*esferas vermelhas*) formados pela ligação de moléculas de anticorpo à superfície celular de antígenos (*esquerda*) podem atrair proteínas do complemento presentes no plasma (*amarelo, verde e violeta*), levando à formação de complexos que conduzem, através de uma série de passos, à formação de canais na membrana plasmática celular, por meio de outras proteínas do complemento (*direita*) em um sítio adjacente àquele onde os complexos antígeno-anticorpo foram inicialmente formados. (B) Os canais resultantes, vistos nesta micrografia eletrônica, destroem a integridade das funções de proteção da membrana plasmática, levando rapidamente à morte celular. (Extraída de C.A. Janeway Jr. et al., *Immunobiology*, 6th Ed., New York: Garland Science, 2005.)

sistema **complemento**, que são capazes de reconhecer regiões constantes das moléculas de anticorpo ligadas à superfície de uma célula (bacteriana, fúngica ou de mamíferos) e de se associar a essas moléculas de anticorpo, produzindo poros na membrana plasmática, levando, conseqüentemente, à morte celular.

Essa série de etapas envolvidas nas respostas humorais adaptativas fornece uma idéia acerca da estrutura molecular de antígenos que são **imunogênicos**, ou seja, que elicitam respostas imunes: tais antígenos não constituem proteínas intactas, mas, em vez disso, são fragmentos oligopeptídicos derivados da clivagem de proteínas muito maiores (veja as Figuras 15.6 e 15.7). (As maiores exceções para essa generalização são algumas cadeias de carboidratos complexas e cadeias laterais associadas que podem, sob certas circunstâncias, ser imunogênicas.)

15.3 Outro tipo de resposta imune adaptativa leva à formação de células citotóxicas

O tipo de resposta imunológica descrito anteriormente não é capaz de eliminar de maneira efetiva agentes infecciosos que tenham entrado nas células e que, assim, estão protegidos pela membrana plasmática. Similarmente, no caso de células tumorais, as respostas do sistema imune humoral não conseguem reconhecer as proteínas celulares anormais que estão no interior dessas células. Em princípio, essa barreira poderia criar sérios problemas para o sistema imune, que precisaria monitorar o que acontece no *interior* das células, além de controlar o que se passa nos espaços extracelulares e na superfície das células.

O problema é solucionado por um mecanismo de apresentação de antígenos que se assemelha àquele descrito anteriormente para as células apresentadoras de antígeno profissionais (APCs). Na realidade, esse outro mecanismo de apresentação de antígenos é o mais comum dos dois, uma vez que é utilizado pela maioria dos tipos celulares do organismo.

Esse sistema funciona da seguinte forma (Figura 15.10): mais do que a ativação para as funções designadas, uma parte das proteínas sintetizadas pelas APCs (estima-se que um terço

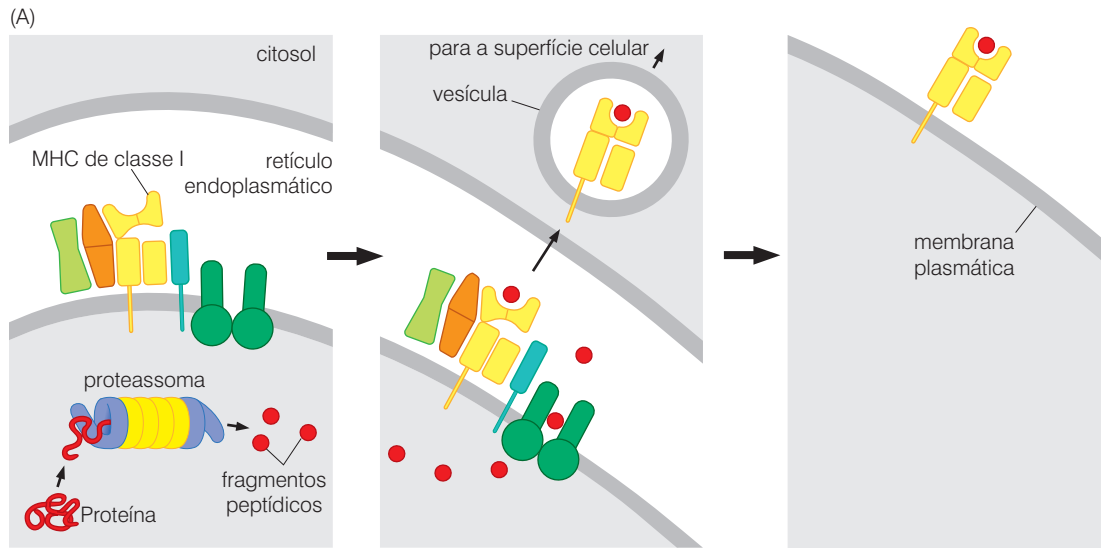
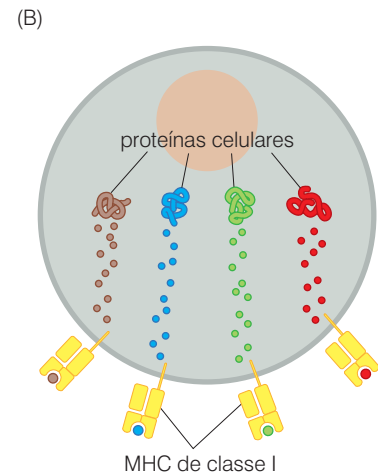


Figura 15.10 Apresentação de antígenos intracelulares por moléculas MHC de classe I. Quase todos os tipos celulares do organismo, incluindo as células tumorais, rotineiramente direcionam uma parte das suas proteínas recém-sintetizadas para a maquinaria de apresentação de antígenos. Algumas das proteínas recém-sintetizadas são direcionadas para os proteossomas (*violeta, amarelo*), nos quais são quebradas em oligopeptídeos (*pontos vermelhos*); os oligopeptídeos resultantes são então introduzidos no retículo endoplasmático, onde podem encontrar moléculas MHC de classe I (*amarelo*) que se ligam de maneira relativamente forte a eles (veja a Figura 15.7B). Isso faz com que os complexos multiproteínas se movam por meio de vesículas membranosas para a superfície celular, onde esses complexos protéicos servirão para apresentar ao sistema imune os fragmentos das proteínas que estão sendo sintetizadas na célula. De maneira geral, esse processo de apresentação de antígenos é similar ao utilizado por moléculas MHC de classe II (Figura 15.6); entretanto, a apresentação de antígenos MHC de classe II é a especialidade de “células apresentadoras de antígeno profissionais”, como macrófagos, células dendríticas e células B, enquanto a apresentação envolvendo moléculas MHC de classe I é realizada rotineiramente por quase todos os tipos celulares do organismo. (B) Uma série de fragmentos de oligopeptídeos derivados de várias proteínas celulares (aqui representadas por quatro espécies distintas de proteínas) são expressos simultaneamente por células usando proteínas MHC de classe I. (C.A. Janeway Jr. et al., Immunobiology, 6th Ed., New York: Garland Science, 2005.)



em certas células) é rotineiramente alvo do sistema de proteossomas. Assim, essas proteínas são clivadas em oligopeptídeos. Esses produtos de clivagem, que contêm 8 a 11 resíduos de aminoácidos, são então ligados a moléculas MHC próximas à superfície celular e, então, expostos no exterior dessas células por uma outra classe maior de moléculas apresentadoras de antígeno – as moléculas MHC de classe I (veja a Figura 15.7B).

Dentre os peptídeos intracelulares apresentados pelas moléculas MHC de classe I, estão aqueles normalmente sintetizados pelas células, bem como aqueles produzidos por agentes que infectaram as células, como vírus e bactérias. Essa apresentação externa de antígenos internos ocorre rotineira e continuamente, independentemente da existência de proteínas estranhas dentro de uma célula.

A apresentação de certos antígenos oligopeptídicos de superfície (via moléculas MHC de classe I) por uma célula pode levar à ativação de células T citotóxicas (T_C 's, também chamadas de linfócitos T citotóxicos, CTLs ou células $CD8^+$), resultando em morte celular (veja a Figura 15.4). A origem dessa capacidade de eliminar células pode estar relacionada com certas ações de células T auxiliares. Como mencionado anteriormente, algumas células T

Figura 15.11 Ativação de células T citotóxicas por células T auxiliares Além de induzir as células B a produzirem moléculas de anticorpos (Figura 15.8), células T auxiliares (T_H) de um segundo subtipo (azul) podem ativar os precursores de células T citotóxicas (vermelho-claro, abaixo), tornando-as células T citotóxicas (chamadas T_C 's ou CTLs, vermelho) que podem usar seus receptores de células T (TCRs) para reconhecer e ligar antígenos apresentados sobre a superfície de muitos tipos celulares ao longo do organismo por meio de moléculas MHC de classe I. Esse reconhecimento resulta no ataque de células que expressam antígenos (cinza, acima), como mostrado pelas micrografias da Figura 15.4B. As T_C 's frequentemente usam grânulos citotóxicos (pontos pretos) contendo perforina e granzimas para matar células-alvo (Figura 15.12).

auxiliares podem ativar respostas imunes humorais pela interação e estimulação de células B produtoras de anticorpos (veja a Figura 15.8). Essa seria uma segunda (e independente) função de células T auxiliares: a ativação de células T citotóxicas, as quais são especializadas em reconhecer e matar as células-alvo que apresentem antígenos oligopeptídicos particulares, iniciando uma resposta imune.

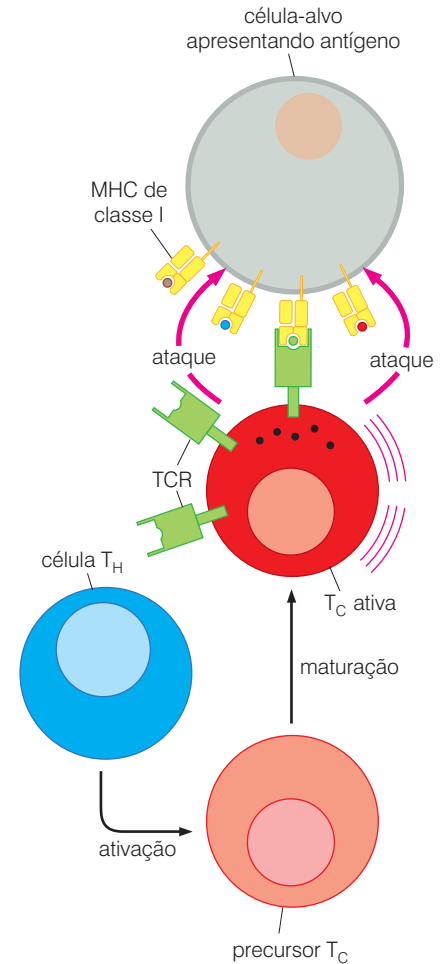
A propriedade de células T auxiliares em facilitar o desenvolvimento de respostas imunes celulares e humorais reflete a capacidade de subpopulações distintas de células T_H de produzir e liberar fatores imunes solúveis conhecidos como citocinas: as T_H s que promovem a imunidade humoral (por estimular células B) produzem interleucina-4 (IL-4), enquanto T_H s que promovem imunidade mediada por células (por estimular células T citotóxicas) secretam interferon- γ (IFN- γ).

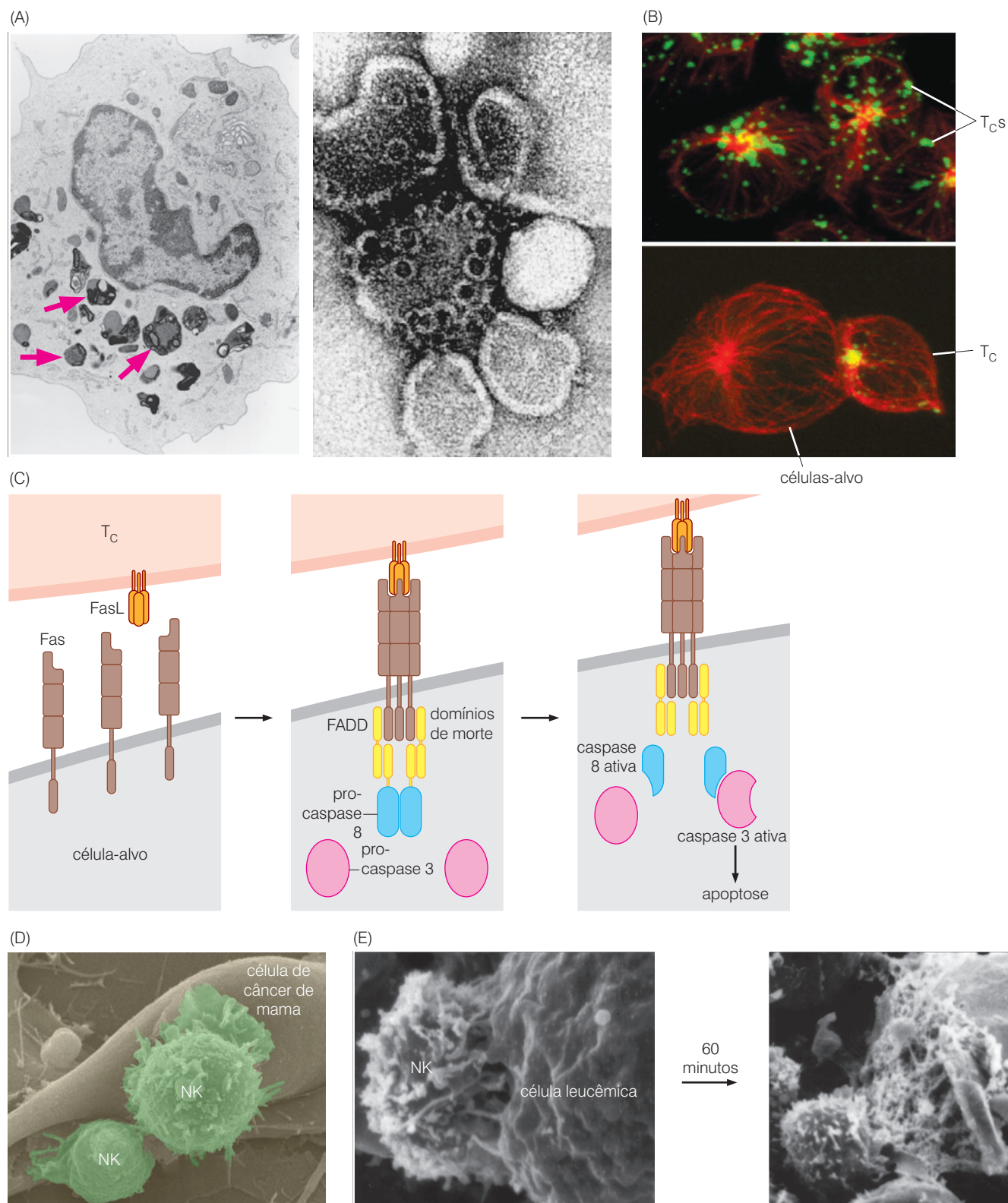
Células T citotóxicas podem eliminar seus alvos celulares por meio de dois mecanismos distintos: primeiro, as células-alvo podem ser expostas a certas proteínas tóxicas (Figuras 15.12A e B). Uma dessas, a **perforina**, forma poros na membrana plasmática celular, os quais permitem que as granzimas liberadas pelas células citotóxicas atinjam o citoplasma celular. Como descrito anteriormente, (Seção 9.14), uma vez presentes no citoplasma das células-alvo, as granzimas clivam e ativam caspases pró-apoptóticas.

O segundo mecanismo de morte celular, também discutido na Seção 9.14, envolve o receptor de morte Fas, o qual é expresso por muitos tipos celulares em todo o organismo. As células T citotóxicas podem apresentar o ligante do receptor Fas, chamado FasL, às células-alvo, ativando as vias apoptóticas extrínsecas (Figura 15.12C).

A ação de células T pode exercer um importante papel em limitar infecções virais disseminadas. Por exemplo, uma célula recentemente infectada, na qual o vírus está em replicação ativa, utiliza moléculas MHC de classe I para exibir os antígenos oligopeptídicos de superfície derivados das proteínas virais clivadas. Essa apresentação antigênica vai alertar o sistema imune de que células anormais estão sendo produzidas dentro da célula. Se o sistema imune está funcionando corretamente, as células T citotóxicas irão reconhecer os antígenos oligopeptídicos expressos pelas moléculas MHC de classe I, matando as células infectadas antes que os vírus sejam capazes de se multiplicar e de liberar as partículas virais.

Isso significa que o sistema imune realmente usa duas formas de resposta imune adaptativa para limitar infecções virais: a resposta celular é usada para matar células infectadas por vírus, enquanto a resposta humoral é ativada para neutralizar partículas virais que tenham sido liberadas nos espaços extracelulares, incluindo a circulação, por marcar essas partículas com moléculas de anticorpo (veja a Figura 15.2A). Como será visto posteriormente, as respostas antivirais representam formas importantes pelas quais o sistema imune pode bloquear o aparecimento de tumores humanos induzidos por vírus.





15.4 A resposta imune inata não depende de sensibilização prévia

Noventa e nove por cento das espécies animais existentes no planeta não apresentam respostas imunes adaptativas para protegê-las do ataque de patógenos. Esses organismos dependem

Figura 15.12 Mecanismos de morte celular por linfócitos citotóxicos Esta micrografia eletrônica de um linfócito citotóxico (T_C , CTL) revela uma série de grânulos líticos em seu citoplasma (*setas cor-de-rosa, painel esquerdo*). Quando o contato é feito com uma célula-alvo (a qual foi inicialmente reconhecida pelos receptores de células T gerados por T_C), esses grânulos liberam perforina, a qual forma canais cilíndricos na membrana plasmática da célula-alvo (*célula central, painel direito*); proteínas pró-apoptóticas como as granzimas (veja a Seção 9.14), que também estão presentes nesses grânulos, são então introduzidas, através desses canais, no citoplasma da célula-alvo, onde é iniciada a cascata de apoptose pela clivagem de procaspases. (B) Na ausência de um alvo celular, os grânulos líticos (*verde, amarelo*), que contêm granzima e perforina, são distribuídos no citoplasma de linfócitos T citotóxicos (T_C 's; *painel superior*). No painel inferior, uma *sinapse* foi formada com a célula-alvo (*esquerda*), e os grânulos líticos se associaram à sinapse a fim de preparar o processo de eliminação da célula-alvo. (C) Um mecanismo alternativo de eliminação de células que são designadas para a destruição depende da expressão de FasL (*laranja*) pelos T_C (*superior, cor-de-rosa*). O FasL, que constitui um trímero, se liga ao receptor Fas (*marrom*) expresso pela célula-alvo (*célula inferior, cinza*) e produz a trimerização do receptor, resultando na ativação da cascata extrínseca da apoptose na célula-alvo, por meio da ativação das caspases 8 e 3 (veja também a Figura 9.31). (D) As células matadoras naturais são programadas para reconhecer ou eliminar outras células, incluindo células tumorais, que não apresentem níveis normais de moléculas MHC de classe I em sua superfície. Esta micrografia eletrônica de varredura (SEM) revela as células matadoras naturais (*coloridas em verde*), uma das quais espalhou uma parte de seu citoplasma na superfície de uma célula de ducto de carcinoma de mama humano, no estágio inicial de um ataque. (E) Esta SEM mostra o ataque inicial de uma célula matadora natural (*painel esquerdo, a menor célula*) sobre uma célula de leucemia. Sessenta minutos mais tarde, a célula matadora natural causou uma destruição extensa da membrana plasmática da célula de leucemia, a qual foi fragmentada e teve sua membrana plasmática condensada em resposta a esse ataque (*painel direito*). (A, C e E, extraída de C.A. Janeway Jr. et al., Immunobiology, 6th Ed., New York: Garland Science, 2005; B, extraído de R.H. Clrk, J.C. Stinchcombe, A. Day et al., *Nat. Immunol.* 4:1111-1120, 2003; D, cortesia de S.C. Watkins e R. Herberman.)

das respostas imunes inatas para sua proteção. De forma importante, esse mecanismo de imunidade inata tem sido conservado na evolução dos mamíferos e continua a exercer um papel crítico em várias respostas imunológicas.

Os componentes celulares da resposta imune inata são capazes de reconhecer e atacar partículas estranhas ou células anormais, mesmo que não haja uma exposição prévia a estes agentes. Assim, esses **imunócitos** (células do sistema imune) reconhecem “instintivamente” células anormais, como células tumorais, nos tecidos do organismo, marcando essas células para o ataque e destruição. Em vez de reconhecer antígenos específicos, as células que medeiam a resposta imune inata reconhecem padrões moleculares característicos que estão presentes na superfície dos agentes infecciosos (ou células transformadas), mas que não são expressos por células normais.

O principal componente de resposta inata são as células matadoras naturais (NK). É provável que o contato inicial do sistema imune com células tumorais seja realizado por NKs. Como será discutido em maiores detalhes em seguida, as células matadoras naturais são capazes de reconhecer configurações de proteínas de superfície celular expressas por uma variedade de tipos de células tumorais. Assim, as células matadoras naturais são pré-programadas para reconhecerem células tumorais a fim de eliminá-las do organismo. Além das células matadoras naturais, outros componentes do sistema imune inato, incluindo macrófagos e neutrófilos, podem contribuir para as respostas imunes inatas contra células tumorais.

Depois que uma célula matadora natural inicia uma resposta imune por reconhecer e atacar uma célula-alvo (Figura 15.12D e E), são produzidas citocinas, especialmente interferon- γ (IFN- γ), a fim de recrutar outras células do sistema imune, incluindo macrófagos, para o sítio de ataque. Os efeitos dessa segunda onda de imunócitos habilitam as células do sistema

imune a iniciar uma série de respostas mais efetivas e específicas, em particular respostas celulares e humorais adaptativas.

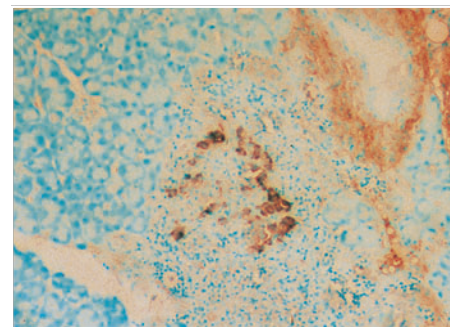
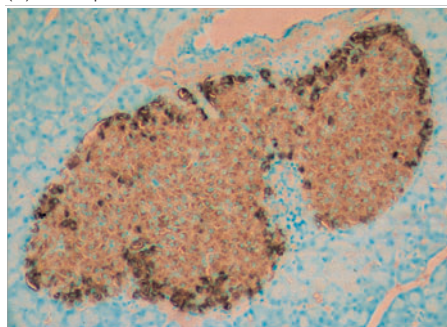
15.5 A necessidade de distinguir o “próprio” do “não-próprio” resulta em tolerância imunológica

O sistema imune é finamente regulado e altamente específico. Mais precisamente, ele deve ser capaz de distinguir proteínas estranhas (p. ex., aquelas produzidas por agentes infecciosos) daquelas produzidas por células do organismo. Como consequência, se os oligopeptídeos apresentados por uma célula normal são similares ou idênticos àqueles encontrados rotineiramente no sistema imune, essa célula vai permanecer intacta aos mecanismos imunes do organismo – uma das manifestações da **tolerância** imune. De fato, a tolerância imune representa um dos maiores enigmas da pesquisa imunológica atualmente: como o sistema imune é capaz de distinguir proteínas e peptídeos estranhos do repertório normal de proteínas? Os imunologistas freqüentemente se referem a esse mecanismo como a capacidade do sistema imune em discriminar o “próprio” do “não-próprio”.

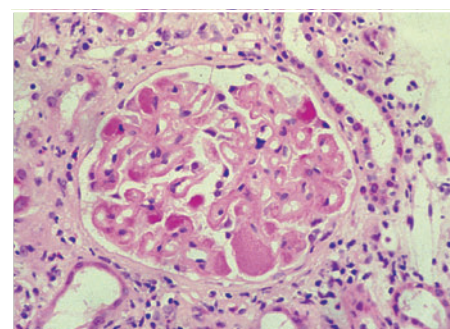
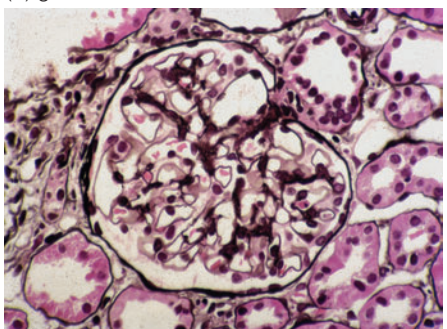
Uma variedade de mecanismos que operam durante o desenvolvimento do sistema imune garante que células T ou B que reconhecem auto-antígenos sejam eliminadas; alternativamente, se essas células não são eliminadas, suas ações são bastante reprimidas. Falhas na deleção de linfócitos próprio-reativos ou auto-reativos a partir de um *pool* de linfócitos do organismo resultam na sobrevivência de células do sistema imune que podem atingir células normais do organismo. Uma vez que células auto-reativas são mantidas, essa falha dos mecanismos de tolerância pode levar ao desenvolvimento de doenças auto-imunes, como artrite reumatóide, colite ulcerativa e lúpus eritematoso, nas quais o sistema imune forma anticorpos e leva células citotóxicas a atacarem células e tecidos normais (Figura 15.13).

Figura 15.13 Destruição de tecidos normais pelo ataque auto-imune. Uma destruição tecidual extensa pode ser provocada pelo sistema imune que é levado a atacar os tecidos normais do organismo. A princípio, os mesmos mecanismos imunes que são ativados aqui também podem ser ativados para atacar e destruir tecidos tumorais. (A) Uma ilhota pancreática normal (i. e., uma ilhota de Langerhans) de um camundongo (*painel à esquerda*) é composta, em grande parte, por células β secretoras de insulina (*marrom-claro*) com um pequeno número de células α na sua periferia (*marrom-escuro*). O pâncreas de um camundongo com diabetes resultante de um ataque auto-imune sobre células β aparece com uma perda quase total dessas células (*painel à direita*). Um glomérulo renal normal (*centro do painel à esquerda*), o qual contém uma rede complexa de túbulos, é responsável pela filtração do plasma e pela produção de urina. Na doença do lúpus eritematoso sistêmico (SLE), um ataque auto-imune sobre a membrana plasmática localizada sob as células epiteliais do glomérulo resulta no acúmulo de proteínas de anticorpo e na invasão de uma variedade de células inflamatórias; juntas, elas finalmente destroem a arquitetura do glomérulo (*direita*) e, assim, a função renal. (A, extraída de C.A. Janeway Jr. et al., *Immunobiology*, 6th Ed., New York: Garland Science, 2005; B, cortesia de A.B. Fogo.)

(A) ilhota pancreática



(B) glomérulo renal



normal

destruição auto-imune

A tolerância imune leva a um ponto simples e óbvio de discussão que será abordado a seguir: como o sistema imune, que é programado para “tolerar” células do próprio organismo, pode reconhecer e atacar células tumorais, as quais são, em grande parte, muito similares, em nível bioquímico, às células normais do organismo? Além disso, se o sistema imune é ativado na defesa contra células tumorais, incluindo aquelas transformadas por vírus tumorais, como poderiam essas células escapar das várias formas de ataque do sistema imune?

15.6 Células T regulatórias são capazes de suprimir componentes maiores da resposta imune adaptativa

Pesquisas iniciadas nos anos 1990 descreveram uma nova classe de células T, que foram denominadas células T regulatórias (células T_{reg} ou simplesmente T_{reg} s). Evidências indiretas acerca da sua existência tiveram origem na observação de que, em indivíduos normais, uma proporção significativa de células T citotóxicas (CTLs) reconhece antígenos de tecidos normais apresentados por moléculas MHC de classe I – uma situação que deveria levar a reações intensas do sistema imune sobre tecidos normais, resultando em doenças auto-imunes. Entretanto, esse tipo de resposta não acontece, aparentemente devido à supressão dos efeitos dessas células pela ação de agentes desconhecidos.

A descoberta das células T_{reg} poderia ser a resposta para isso, já que elas são capazes de bloquear as ações de células T citotóxicas distribuídas nos tecidos. De fato, camundongos com deleção gênica das células T_{reg} desenvolvem doença auto-imune letal; um quadro comparativamente agressivo, que por fim resulta em doença auto-imune fatal, tem sido descrito em humanos que não produzem T_{reg} s.

Assim como as células T auxiliares (T_H), as T_{reg} s expressam antígenos CD4 em sua superfície. Todavia, as T_{reg} s são distinguidas pela expressão adicional do antígeno CD25 e pela expressão de um fator transcricional chamado FOXP3, responsável por programar seu desenvolvimento. Uma vez que as T_{reg} s expressam receptores de células T antígeno-específicos (TCRs; veja a Figura 15.4), elas podem bloquear especificamente as ações dos linfócitos T citotóxicos cujos TCRs reconhecem os mesmos antígenos. Além disso, quando localizadas nos linfonodos, as T_{reg} s são capazes de prevenir a ativação de células T_H pelas células dendríticas. Acredita-se que as T_{reg} s devam estar bastante próximas das células T_H e T_C que elas suprimem, e que a liberação de TGF- β e interleucina-10 (IL-10) pelas T_{reg} s é frequentemente usada para inibir ou eliminar outros tipos de linfócitos T.

O conhecimento acerca das T_{reg} s ainda é limitado. Contudo, é possível que suas ações sejam a chave para explicar a patogênese de diversas doenças auto-imunes. Ao mesmo tempo, os efeitos das T_{reg} s poderiam explicar como muitos tipos de células tumorais podem proliferar na presença de um grande número de CTLs, que deveriam, supostamente, ser capazes de eliminá-las – um tópico que será abordado mais adiante neste capítulo.

Uma visão geral sobre os vários componentes do sistema imune discutidos até o momento é apresentada na Figura 15.14.

15.7 A teoria da imunovigilância e suas limitações

Como sugerido previamente, no início deste capítulo, a idéia de que o sistema imune poderia fazer a defesa contra células tumorais é bastante antiga. As especulações de Burnet, em 1957, sobre o papel do sistema imune no monitoramento de doenças e na detecção da presença de tumores, juntamente com as considerações feitas por Lewis Thomas, representam as primeiras proposições indicativas de mecanismos bastante articulados na **imunovigilância** do câncer.

Em tempo, microrganismos infectantes, especificamente bactérias, vírus e fungos, são conhecidos pela alta capacidade imunogênica, o que leva à ativação de respostas imunes capazes de erradicar

completamente a infecção, por meio de vários mecanismos imunológicos distintos. Por analogia, seria lógico pensar que o sistema imune faria um monitoramento contínuo dos tecidos, podendo detectar a presença de células tumorais. Uma vez identificadas – continuando dentro da mesma linha de pensamento – o sistema imune iria tratar essas células como agentes estranhos, eliminando-as, antes que elas pudessem proliferar e originar formas agressivas de câncer.

Tentativas realizadas nos anos 1950 para comprovar esse modelo não foram conclusivas. Quando tumores eram removidos de alguns camundongos e implantados em outros, os tumores eram destruídos rapidamente, de uma forma que indicava claramente a ativação de uma resposta imune intensa. Entretanto, logo se tornou claro que essa resposta não estava relacionada à natureza *neoplásica* das células tumorais. Em vez disso, sua eliminação era consequência de um processo chamado de **rejeição de transplantes**. Assim, células e tecidos de um camundongo de uma linhagem são invariavelmente reconhecidos como estranhos quando implantados em camundongos de uma outra cepa. Isto acontece porque células de camundongos de cepas distintas apresentam moléculas do complexo de histocompatibilidade

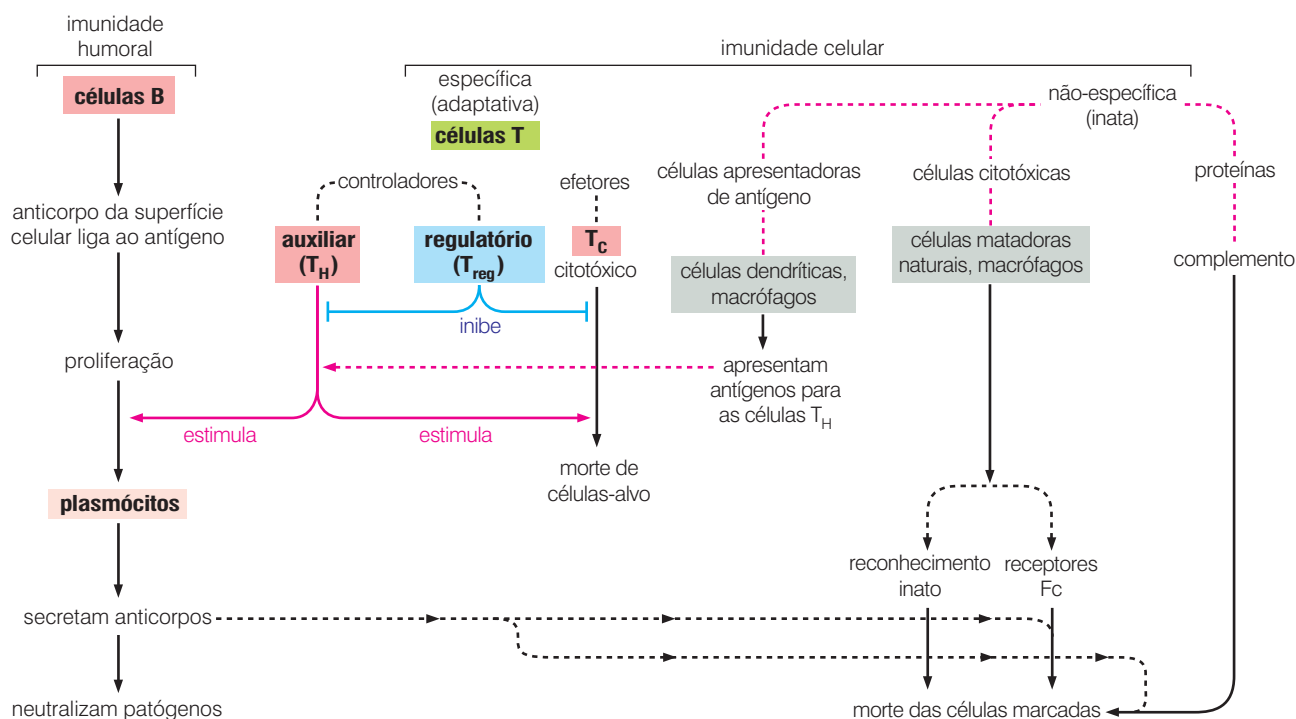


Figura 15.14 Visão geral dos componentes humoral e celular do sistema imune O sistema imune humoral (esquerda) é dirigido pelas ações das células B que desenvolvem milhões de moléculas de anticorpo antígeno-específicas por meio do rearranjo de genes que codificam anticorpos e da diversificação das seqüências que codificam sítios de combinação com antígenos nas regiões V das moléculas de anticorpo. Essa resposta humoral depende da ativação de células T auxiliares (T_H), as quais dependem, por sua vez, da ativação prévia nos linfonodos pelas células apresentadoras de antígeno, majoritariamente, células dendríticas. Essas células convertem proteínas em oligopeptídeos que são reconhecidos pelos receptores de células T das células T_H , os quais iniciam a ativação de células B que tenham desenvolvido, ao acaso, anticorpos que reconhecem antígenos oligopeptídicos.

Receptores de células T (TCRs) são ainda utilizados por células T citotóxicas (T_C) (também chamadas de CTLs), as quais se valem desses receptores para reconhecer e matar células-alvo que expressem antígenos cognatos. A ativação das células T_C também depende da estimulação prévia de células T_H . Uma terceira classe de células T que igualmente apresenta receptores de células T antígeno-específicos é composta pelas células T regulatórias, frequentemente chamadas de T_{reg} s. Estas exercem papéis importantes na supressão das ações tanto de células T_C como de T_H e assim previnem a ativação

inapropriada de respostas imunes que poderiam, de outra forma, levar à quebra de tolerância, resultando em doenças auto-imunes.

Essas várias manifestações da imunidade adaptativa são aumentadas pelos elementos do sistema imune inato (direita), especialmente pelos tipos celulares que podem auxiliar na eliminação de patógenos e células tumorais sem qualquer “instrução” anterior por meio da exposição prévia a estes. Assim, células matadoras naturais (NK) são levadas a matar muitos tipos de células tumorais por causa da configuração anormal das moléculas de superfície celular apresentadas por essas células; macrófagos são também capazes de reconhecer e matar muitos patógenos celulares sem qualquer exposição prévia a esses agentes. Embora os macrófagos e as células matadoras naturais não possam, por si só, reconhecer a maior parte dos antígenos de superfície celular, a marcação de células-alvo potenciais por moléculas de anticorpo (produzidas pela resposta imune adaptativa) irá atrair macrófagos e células matadoras naturais, as quais vão usar seus receptores Fc para ligar a regiões constantes (C) das moléculas de anticorpo, procedendo à eliminação das células marcadas com anticorpo. Similarmente, o grupo complexo de proteínas plasmáticas conhecidas como complemento pode também reconhecer moléculas de anticorpo ligadas à superfície de uma célula e então matar essa célula por formar canais em sua membrana plasmática.

(MHC) em sua superfície. (Nesse caso, entretanto, não são os antígenos oligopeptídicos que originam a resposta imune, mas as próprias moléculas MHC, as quais variam discretamente em relação à estrutura, entre uma linhagem e outra de camundongos.)

Por exemplo, células tumorais de camundongos BALB/c implantadas em camundongos C57/BL6, e vice-versa, foram reconhecidas como estranhas (e assim foram *histoincompatíveis*) (Figura 15.15). Essas rejeições de tecidos de linhagens de camundongos dissimilares, **alôgenicas** (i. e., geneticamente distintas) não foram observadas quando células tumorais de origem BALB/c foram transplantadas em hospedeiros BALB/c, isto é, em hospedeiros **singênicos** que, por definição, compartilhavam uma bagagem genética idêntica e antígenos de histocompatibilidade idênticos aos das células transplantadas. (De fato, o termo **histocompatibilidade** deriva da observação de que tecido [“histo”] de camundongos de uma linhagem intracruzada pode ser enxertado e acomodado nos corpos de outros membros da mesma linhagem genética e é, nesse sentido, “compatível”).

O fenômeno de rejeição de tumores representou um atraso no campo da imunologia tumoral, já que não houve qualquer elucidação sobre como o sistema imune de camundongos ou de humanos poderia reconhecer células tumorais originadas de seus próprios tecidos. Ademais, esses estudos deram origem a um paradigma extremamente importante: além de eliminar micróbios e vários tipos de vírus, o sistema imune é capaz de destruir células de mamíferos que ele reconhece como estranhas ou, muito possivelmente, como anormais. Como um outro ponto, essas observações da função imune levaram à conclusão que células tumorais jamais seriam transmitidas de um indivíduo para outro (veja a Figura 15.16).

Uma estratégia alternativa foi então empregada para analisar o problema da imunovigilância. Se o sistema imune fosse realmente responsável pela supressão do aparecimento de tumores, animais com comprometimento imunológico deveriam apresentar taxas mais elevadas de câncer. Esses tipos de tumores, os quais foram gerados no seu próprio organismo – também chamados de tumores **autóctones** – apresentaram, sem dúvida, o mesmo tipo de histocompatibilidade que os outros tecidos desses animais. Nessas situações, os mecanismos de histocompatibilidade (e incompatibilidade) se tornam irrelevantes.

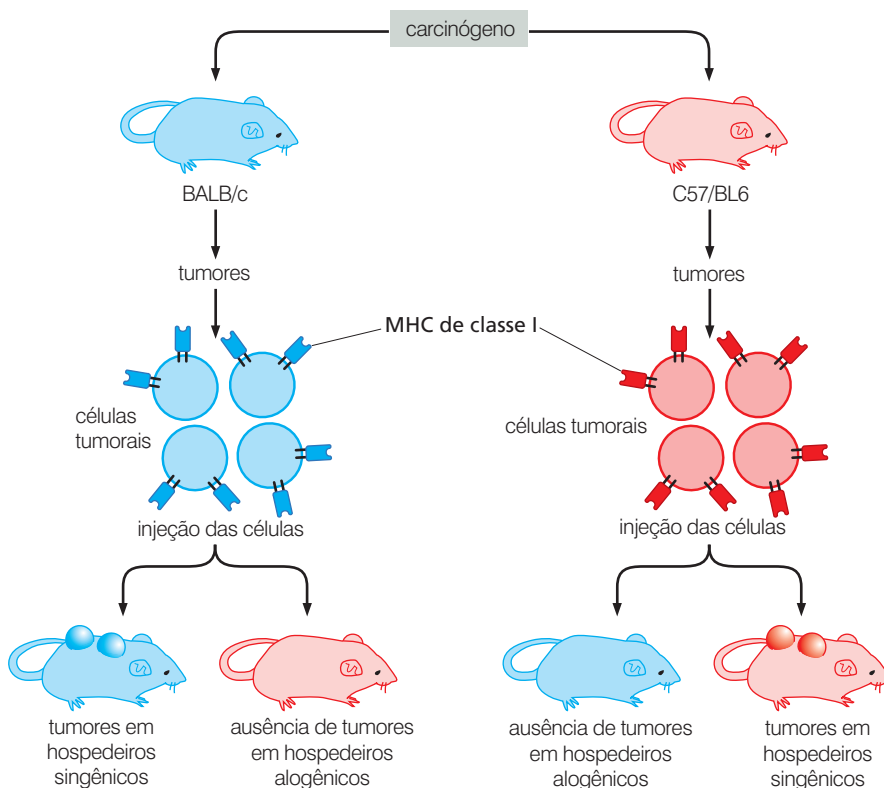
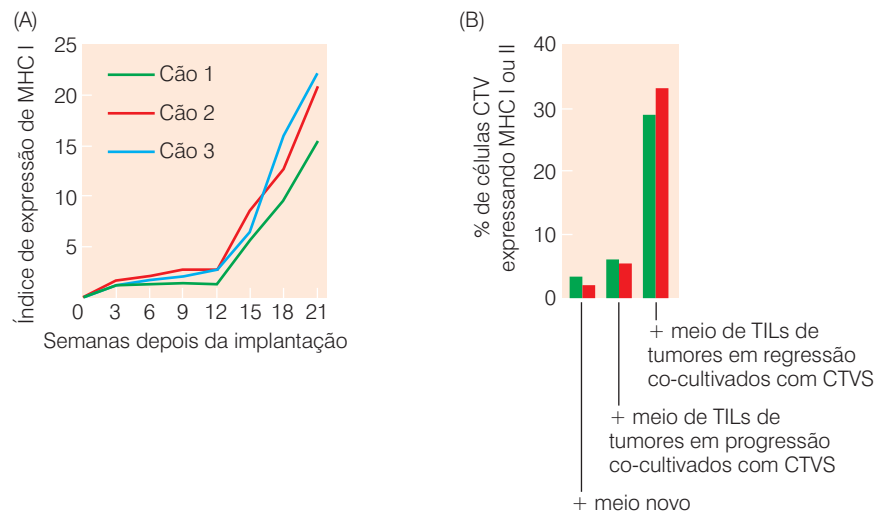


Figura 15.15 Camundongos singênicos e variabilidade MHC O uso de linhagens de camundongos isogênicos revelou que os maiores determinantes da imunogenicidade das células desses camundongos (e dos mamíferos em geral) são as moléculas MHC de classe I. Essas moléculas são altamente polimórficas dependendo da espécie, o que indica que um indivíduo (ou uma linhagem isogênica de camundongos) quase sempre tem um arsenal diferente de moléculas MHC de classe I em relação a outro (vermelho, moléculas de superfície celular azuis). Assim, se um tumor é originário de um camundongo BALB/c, ele em geral é transplantável para um hospedeiro singênico, isto é, outro camundongo BALB/c, mas não para um hospedeiro alôgenico, como o camundongo C57/BL6. O contrário é verdadeiro para tumores originados de camundongo C57/BL6.

Figura 15.16 Regressão de CTVS e re-expressão de antígenos MHC. Uma exceção à regra da não-transmissibilidade do câncer de um organismo a outro é representada pelo sarcoma venéreo transmissível canino; as células são transmitidas sexualmente de um cão para outro. As células transferidas formam inicialmente um tumor de crescimento marcante, o qual é rejeitado depois de vários meses. (A) Enquanto as células do sarcoma venéreo transmissível canino (CTVS) expressam inicialmente níveis muito baixos de proteínas MHC de classe I, após 12 semanas de crescimento do tumor, essas proteínas começam a ser reexpressas, como visto aqui em tumores desenvolvidos em três cães. (B) Essa reexpressão resulta, ao menos em parte, de sinais liberados por linfócitos infiltrantes de tumores (TILs). Meio de cultura fresco tem pouco efeito sobre a expressão de proteínas MHC de classe I (verde) ou de classe II (vermelho) pelas células CTVS (esquerda). Fatores liberados pelos TILs isolados de tumores em progressão (primeiras 12 semanas) também têm um pequeno efeito (meio). Entretanto, fatores liberados pelos TILs de tumores em regressão (12 a 21 semanas) induzem marcadamente a expressão de proteínas MHC (direita) por células CTVS em cultura. Essa reexpressão parece ser responsável pela regressão do tumor *in vivo*. (Extraída de Y.W. Hsiao, K.W. Liao, S.W. Hung e R.M. Chu, *J. Immunol.* 172: 1508-1514, 2004.)



No final dos anos 1960, camundongos da linhagem Nude imunossuprimidos se tornaram disponíveis para a pesquisa do câncer. Esses camundongos não possuem um timo funcional – o órgão no qual linfócitos T do sistema imune se desenvolvem inicialmente. A falta de pêlos, uma outra característica fenotípica dessa cepa, deu origem ao seu nome (veja a Figura 3.13).

As pesquisas que se seguiram no início e meados dos anos 1970 revelaram que esses camundongos não são mais suscetíveis ao desenvolvimento de tumores espontâneos, nem de tumores autóctones induzidos quimicamente, quando comparados aos animais selvagens. Dessa forma, a teoria da imunovigilância teve a sua maior queda, tendo falhado no teste mais crítico para sua validação. A teoria perdeu a sua credibilidade e ainda o posto principal que ocupou na pesquisa do câncer durante duas décadas.

Mas sua rejeição foi prematura. Apenas alguns anos mais tarde, ficou claro que apesar de não possuírem linfócitos T normais, os camundongos da linhagem Nude apresentavam todos os outros componentes do sistema imune de forma intacta. Por exemplo, alguns tipos de células T podem se desenvolver fora do timo, o sítio normal de maturação dessas células. Além disso, um tipo muito importante de célula imune – as células matadoras naturais (NK) – é capaz de se desenvolver completamente fora do timo e, assim, está presente em grande número nos camundongos Nude.

Nos anos 1980, foram obtidas evidências convincentes de que células matadoras naturais são realmente importantes para o reconhecimento e a eliminação de uma variedade de células anormais, incluindo células tumorais. Finalmente, as conclusões retiradas a partir das baixas taxas de câncer nos camundongos Nude tiveram um valor limitado, já que esses animais continuavam a apresentar componentes funcionalmente importantes do sistema imune. De qualquer forma, camundongos Nude, bem como outros tipos de camundongos imunocomprometidos, têm se mostrado de grande valor na pesquisa do câncer.

Também foram apresentadas evidências de que certos tumores induzidos quimicamente em camundongos eram antigênicos e poderiam ser reconhecidos e eliminados pelo sistema imune. Por exemplo, em um grupo de experimentos, células de um tumor induzido por 3-metilcolantreno (3MC) foram irradiadas previamente à injeção em camundongos, a fim de prevenir a sua proliferação nos hospedeiros (Figura 15.17). (A indução química do tumor foi realizada na mesma cepa de camundongos em que as células foram injetadas.) Subseqüentemente, os camundongos receberam uma segunda injeção de células tumorais viáveis originadas do mesmo tumor ou ainda de um outro tipo de tumor induzido por 3MC; as células provenientes do mesmo tumor não cresceram, enquanto as células do outro tipo de tumor proliferaram e formaram uma nova massa tumoral. Isso indica que os dois tumores são antigenicamente distintos e que a exposição inicial a células mortas foi capaz de imunizar os camundongos contra células vivas originárias do mesmo tumor.

Assim, células tumorais que apresentam antígenos diferentes, sob certas condições, poderiam incitar o sistema imune a atacar e eliminar tais células.

15.8 O uso de camundongos geneticamente modificados leva ao ressurgimento da teoria da imunovigilância

Na metade dos anos 1990, várias linhas de pesquisa deram uma nova direção à, então desacreditada, teoria da imunovigilância. Esses experimentos foram realizados em virtude do advento da tecnologia para a geração de linhagens de camundongos com alterações gênicas. Essa técnica (veja a Barra lateral 7.10) foi explorada para criar camundongos cujo genoma apresentava a deleção de um ou mais genes conhecidos por exercerem papéis fundamentais no funcionamento do sistema imune.

Um grupo de experimentos empregou camundongos com deleção do receptor para o interferon- γ por meio da inativação direcionada do gene responsável por sua linhagem germinativa. Assim como fatores de crescimento, o IFN- γ é um fator protéico difusível que faz a sinalização entre células e induz respostas celulares por ligar e ativar um receptor de superfície cognato. De forma importante, não há relatos para a liberação de IFN- γ a partir de outras células que não pertençam ao sistema imune. Consequentemente, quaisquer mudanças observadas após a deleção do gene para o receptor de IFN- γ do genoma de camundongos poderiam ser atribuídas a defeitos associados a células imunes ou a suas interações com o restante das células do organismo. De maneira interessante, camundongos com deleção gênica do receptor de IFN- γ de todas as células foram 10 a 20 vezes mais suscetíveis para a indução de tumores pelo carcinógeno químico 3-metilcolantreno.

Em uma outra série de experimentos, as células tumorais foram induzidas a expressar um receptor para IFN- γ mutante, não responsivo ao IFN- γ liberado por vários tipos de imunócitos. Essas células foram então injetadas em camundongos selvagens e apresentaram um perfil mais tumorogênico do que outras células que continham o receptor funcional. Esses experimentos em particular sugeriram que o receptor para IFN- γ expresso por células tumorais as torna capazes de responder ao IFN- γ liberado de imunócitos, e essa resposta geralmente previne ou retarda o crescimento de tumores formados por essas células.

Esses efeitos interessantes do IFN- γ poderiam ser associados, pelo menos em parte, às ações das células matadoras naturais. As células matadoras naturais foram descobertas e assim denominadas por sua capacidade inata de reconhecer células tumorais como anormais, eliminando-as. Uma vez que as células matadoras naturais identificam células tumorais como alvos a serem eliminados, elas levam à produção local de IFN- γ . O IFN- γ liberado, por sua vez, inicia uma série de respostas distintas.

Como mencionado anteriormente, o IFN- γ capacita as células matadoras naturais a atrair outros tipos de células imunes para auxiliar na eliminação das células tumorais, amplificando, dessa maneira, as respostas do sistema imune. Dentre as células imunes responsivas estão os macrófagos, os quais não apenas auxiliam o processo de eliminação celular de forma direta, mas também indiretamente, funcionando como células apresentadoras de antígenos profissionais (APCs) que processam e expressam moléculas antigênicas derivadas das células-alvo (veja a Figura 15.6).

Ao mesmo tempo, o IFN- γ estimula as células tumorais a apresentarem, em sua superfície, níveis aumentados de moléculas MHC de classe I, que podem carregar antígenos oligopeptídicos capazes de evocar respostas imunes adaptativas ainda mais refinadas. Isso ajuda a explicar por que células transformadas que não possuem o receptor para IFN- γ são mais tumorogênicas do que células que apresentam esse receptor. Todas essas respostas foram alteradas em camundongos com deleção gênica para o receptor de IFN- γ ; esses camundongos também apresentaram maior suscetibilidade ao desenvolvimento de certos tumores espontaneamente. Quando analisados em conjunto, tais experimentos fornecem evidências convincentes acerca do papel fundamental do sistema de imunovigilância nos mecanismos de tumorogênese, ao menos de tumores induzidos quimicamente em camundongos.

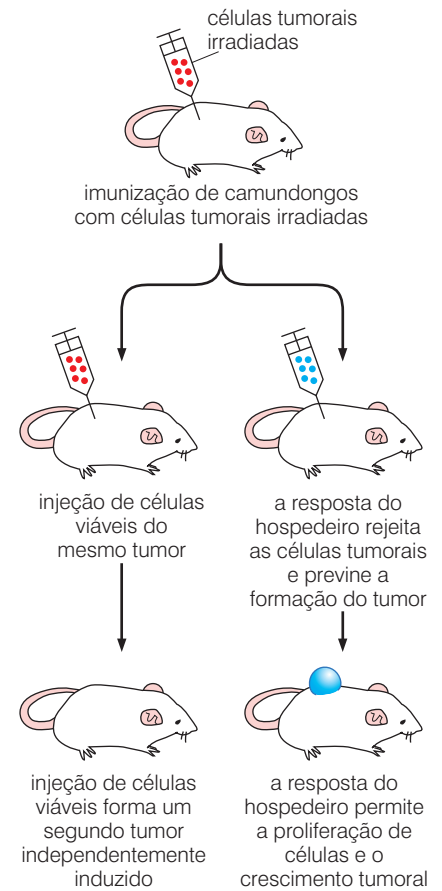
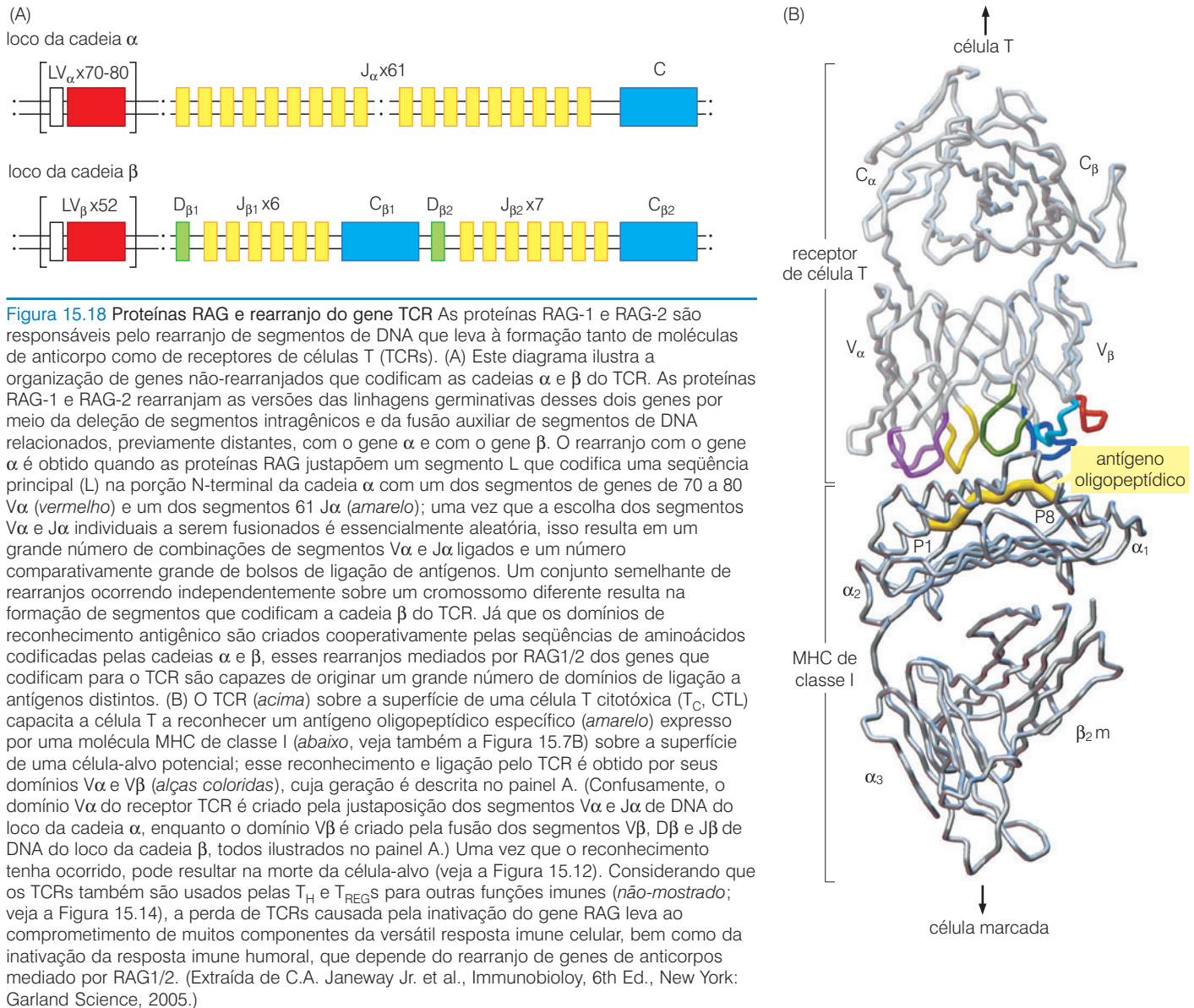


Figura 15.17 Imunização de camundongos pela exposição de células tumorais mortas. Camundongos foram inicialmente injetados com células tumorais irradiadas (vermelho) derivadas de um tumor induzido quimicamente. Quando esses camundongos foram subsequentemente injetados com células vivas do mesmo tumor, as células não cresceram (esquerda, inferior). Entretanto, quando eles foram injetados com células vivas de um segundo tumor (azul), as células proliferaram e formaram uma massa tumoral (direita, inferior). O experimento recíproco (não-mostrado) produz resultados opostos, isto é, a injeção de células tumorais azuis mortas tornaram os camundongos imunes ao tumor azul, mas não ao tumor vermelho.



A teoria da imunovigilância foi reforçada por dados obtidos com camundongos que apresentavam deficiência no gene que codifica a perforina, a proteína utilizada pelos linfócitos e pelas células matadoras naturais para eliminar células-alvo. Cabe lembrar que a perforina é utilizada por células citotóxicas para produzir poros na membrana plasmática de células a serem eliminadas, permitindo a entrada de granzimas indutoras de apoptose (veja a Figura 15.12A). Camundongos com alterações genéticas para a produção de perforina apresentaram uma incidência aumentada do número de tumores espontâneos e foram mais suscetíveis ao desenvolvimento de tumores após a exposição ao 3-metilcolantreno.

Similarmente, um aumento da suscetibilidade ao câncer foi observado em camundongos com deleção gênica para as proteínas RAG-1 e RAG-2; essas duas proteínas são responsáveis pelo rearranjo dos genes que codificam moléculas solúveis de anticorpos, bem como daqueles que codificam os receptores de células T (TCRs) de reconhecimento antigênico (Figura 15.18). Esses camundongos sem RAG-1 ou 2 não apresentam linfócitos T ou B, células $T\gamma\delta$ (não discutidas posteriormente neste capítulo) e uma subclasse de células matadoras naturais, denominadas células matadoras naturais T. Como consequência, eles têm as respostas imunes adaptativas seriamente comprometidas.

Por exemplo, em um experimento, o tratamento com 3-MC induziu o desenvolvimento de sarcomas em 30 de 52 camundongos RAG-2^{-/-}, enquanto apenas 11 de 57 animais selvagens com a mesma bagagem genética e tratados em paralelo formaram esses tumores. Os animais mutantes foram bem mais suscetíveis ao desenvolvimento de tumores espontâneos. Assim, 50% dos camundongos negativos para RAG-2 com mais de 18 meses apresentaram neoplasias gastrointestinais espontaneamente – um tipo de tumor que é relativamente raro em camundongos selvagens da mesma idade.

Possivelmente, a evidência mais convincente acerca do papel da imunovigilância na prevenção do câncer se origina de estudos detalhados sobre o crescimento de sarcomas induzidos por 3-MC em camundongos selvagens e RAG2^{-/-}. Quando células tumorais preparadas desses dois grupos de sarcomas foram transplantadas em outros camundongos RAG2^{-/-}, ambos os grupos de sarcomas produziram tumores nos novos hospedeiros com alta eficiência (Figura 15.19).

Todavia, um perfil bastante distinto foi observado quando células tumorais foram transplantadas em camundongos selvagens singênicos (e, portanto, imunocompetentes). Células de 17 tumores previamente induzidos em camundongos selvagens foram capazes de gerar tumores em todos os novos hospedeiros. Ao contrário, células de 8 de 20 tumores que foram previamente induzidos por 3-MC em camundongos RAG2^{-/-} não produziram tumores, sendo rejeitados pelo sistema imune dos animais selvagens (veja a Figura 15.19).

Essas observações abriram novas perspectivas sobre uma nova dimensão da imunologia tumoral. Elas são sugestivas de que, quando células transformadas por 3-MC crescem em um hospedeiro imunocompetente, aquelas que parecem ser *fortemente imunogênicas* (e, assim, capazes de evocar algum tipo de resposta imune) são efetivamente eliminadas pelo hospedeiro, resultando na sobrevivência e no crescimento de células tumorais que se tornaram *fracamente imunogênicas*. Estas últimas podem proliferar e formar tumores em seus hospedeiros de origem ou fazer o mesmo quando transplantadas para outros hospedeiros imunocompetentes. Assim, esses tumores representam uma subclasse daqueles que originalmente cresceram nos hospedeiros primários. Os tumores altamente imunogênicos são aparentemente eliminados no início da progressão tumoral pelo sistema imune do hospedeiro (veja a Figura 15.19).

Por outro lado, quando células transformadas por 3-MC crescem em um hospedeiro imunocomprometido (veja a Figura 15.19A), duas classes de tumores são inicialmente formadas, como anteriormente – aquelas que são muito imunogênicas e aquelas que são pouco imunogênicas; ambos os tipos de células tumorais sobrevivem em um hospedeiro imunodeficiente. Mais tarde, quando esses tumores são transplantados em hospedeiros imunocompetentes, aqueles tumores que apresentam alto potencial imunogênico não formam tumores, enquanto aquelas que são pouco imunogênicas são capazes de originar tumores. Pode-se concluir que, em camundongos tipo selvagem, um sistema imune funcional exerce um papel importante e efetivo na eliminação de uma fração significativa dos tumores induzidos inicialmente por 3-MC.

Estes dados indicam que o sistema imune desses camundongos exerce um papel ativo na determinação da identidade de tumores em crescimento e dos antígenos que eles expressam. Essa intervenção ativa no fenótipo tumoral tem sido denominada de **imunoedição**, para indicar a eliminação de alguns tumores e a tolerância a outros. A imunoedição pode ser considerada um tipo de seleção darwiniana, no qual a força seletiva é criada pelo ataque direcionado do sistema imune sobre tumores incipientes.

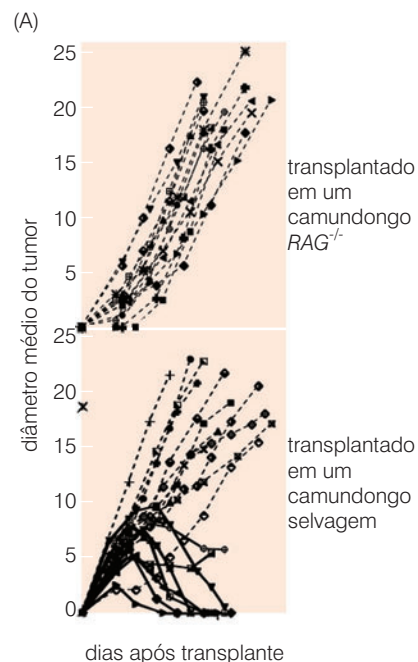
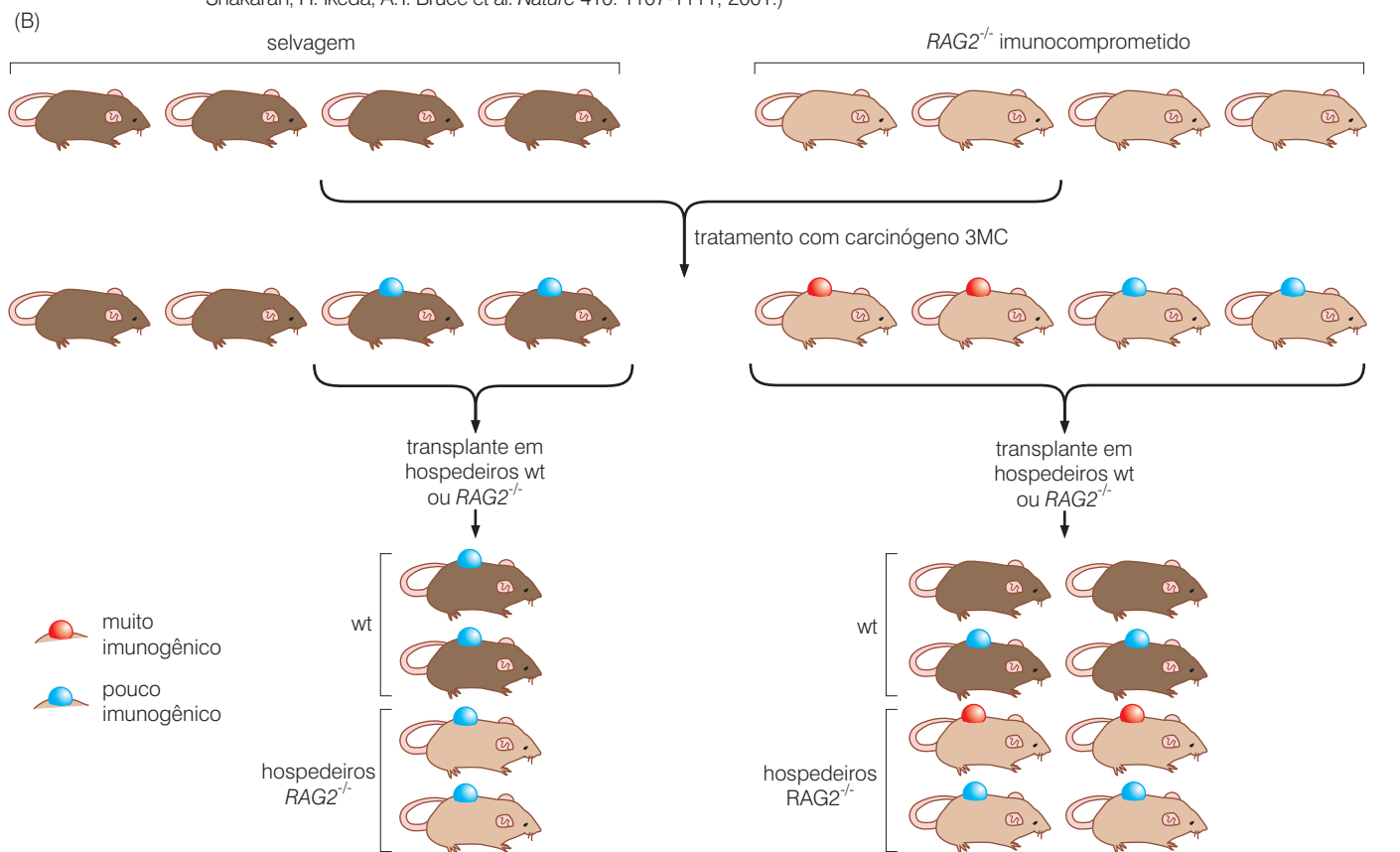
15.9 O sistema imune humano exerce um papel crucial na eliminação de vários tipos de câncer

Uma vez que a biologia de camundongos e humanos difere em muitos aspectos, é necessário interpretar os resultados apresentados anteriormente com cautela, quando se tenta compreender o papel do sistema imune humano na defesa contra o câncer. Além disso, os carcinógenos

químicos usados nos experimentos descritos anteriormente podem originar tumores em camundongos que estão longe de ser mais imunogênicos ou antígenicos do que aqueles que crescem espontaneamente em humanos (a ser discutido na Seção 15.12).

Figura 15.19 Efeitos da função imune sobre o desenvolvimento de respostas

imunes antitumorais Ambos, camundongos selvagens e $RAG2^{-/-}$ imunocomprometidos, foram expostos ao potente carcinógeno 3-metilcolantreno (3-MC). (A) Quando os tumores induzidos nos camundongos $RAG2^{-/-}$ foram transplantados novamente nos hospedeiros $RAG2^{-/-}$, todos eles originaram tumores (*acima*). Entretanto, quando os tumores induzidos nos camundongos $RAG2^{-/-}$ foram transplantados novamente em hospedeiros selvagens, 8 de 20 tumores não se formaram (*abaixo*). Cada linha representa a cinética e crescimento de um único tumor implantado. (B) Este e outros experimentos utilizando tumores induzidos em camundongos selvagens (*não-mostrado*) são resumidos aqui. Depois da exposição ao 3-MC, os camundongos selvagens desenvolveram menos tumores (*azul*) do que os mutantes $RAG2^{-/-}$ (*azul e vermelho*). Os tumores de dois grupos de camundongos foram removidos, e as células de cada grupo foram transformadas em uma linhagem celular que poderia ser propagada *in vitro*. As células de cada uma dessas linhagens foram transplantadas de novo tanto em camundongos selvagens quanto em $RAG2^{-/-}$. As células de todos os tumores que apareceram inicialmente nos camundongos selvagens (*azul*) foram capazes de formar novos tumores em ambos os hospedeiros, selvagens e $RAG2^{-/-}$ (*esquerda*). No entanto, células de todos os tumores originados e crescidos inicialmente nos $RAG2^{-/-}$ foram capazes de formar novos tumores nos camundongos $RAG2^{-/-}$ (*vermelho, azul*), mas apenas algumas delas foram capazes de originar tumores nos selvagens (*direita*). Esses experimentos sugeriram que o 3-MC induziu inicialmente dois tipos de células tumorais em todos os camundongos: muito imunogênicas (*vermelho*) e pouco imunogênicas (*azul*). Ambas, células vermelhas e azuis, formaram tumores nos camundongos $RAG2^{-/-}$, mas apenas as células azuis formaram tumores nos camundongos selvagens, já que quaisquer células tumorais vermelhas formadas foram eliminadas pelos sistemas imunes funcionais destes camundongos. Isso indicou que os tumores que se desenvolveram nos camundongos selvagens já foram selecionados como sendo fracamente imunogênicos e, assim, capazes de formar novos tumores em outros camundongos selvagens. (A, extraída de V. Shakaran, H. Ikeda, A.T. Bruce et al. *Nature* 410: 1107-1111, 2001.)



(A)

Tecido transplantado	Nº de transplantes nos EUA (2002)
rim	15.680
fígado	5.594
coração	2.231
pâncreas	1.492
pulmão	1.077
córnea	~40.000
medula óssea	15.000

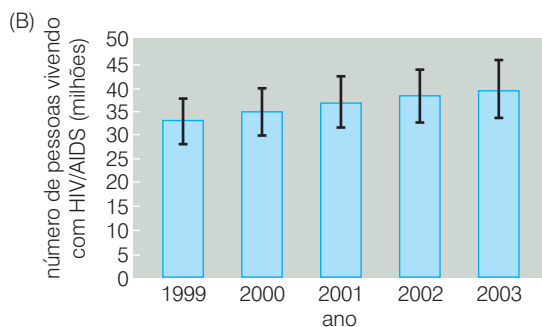


Figura 15.20 Populações imunossuprimidas (A) O número de transplantes de órgãos realizados tem crescido progressivamente nas últimas 2 décadas. Essa tabela lista o número de transplantes de órgão de vários tipos que foram realizados nos Estados Unidos no ano de 2002. (Em meados de 2003, mais de 66.000 transplantes de coração e 17.000 de pulmão tinham sido realizados mundialmente desde que esses procedimentos foram introduzidos na clínica.) (B) O número de indivíduos imunossuprimidos por serem receptores de órgãos de doadores alogênicos ultrapassou o número de pessoas que foram infectadas pelo vírus da imunodeficiência humana e que estão em vários estágios de desenvolvimento da AIDS. (A, extraída de C.A. Janeway Jr. et al., *Immunobiology*, 6th Ed., New York: Garland Science, 2005; B, extraída da Organização Mundial de Saúde Atualização Epidêmica da AIDS, 2003.)

Entretanto, evidências obtidas na década de 1990 fornecem indicações claras de que o sistema imune humano exerce um importante papel na eliminação do câncer. De grande relevância são as observações indicando que indivíduos imunocomprometidos são mais suscetíveis do que a população geral a desenvolver câncer.

Na verdade, não havia muitos indivíduos imunocomprometidos até recentemente. Aqueles que nasciam com sistema imune não-funcional morriam no início da vida, enquanto outros que apresentavam um comprometimento do sistema imune em fases mais adiantadas morriam em consequência de doenças infecciosas. Contudo, nas últimas décadas, o número de indivíduos que sobrevivem por períodos prolongados, mesmo sendo imunodeficientes, tem aumentado dramaticamente, por três razões.

Primeiramente, transplantes de órgãos envolvendo rim, coração e fígado se tornaram comuns no mundo desenvolvido (Figura 15.20A). Uma vez que esses órgãos são de doadores, na maioria das vezes geneticamente diferentes, as células do doador são reconhecidas como estranhas (i. e., alogênicas e, portanto, imuno-incompatíveis) pelo sistema imune do indivíduo transplantado, sendo ativados mecanismos de rejeição. Essa reação indesejável do sistema imune contra órgãos transplantados pode ser controlada pelo tratamento crônico com várias classes de drogas imunossupressoras.

Segundo, independentemente das imunodeficiências induzidas clinicamente, estão os 40 milhões de pessoas infectadas pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) no mundo; como consequência, existe um aumento do número de indivíduos que sofrem da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS; Figura 15.20B). Terceiro, o longo tempo de vida das pessoas imunocomprometidas, incluindo transplantados e muitos pacientes infectados com o HIV, tem sido favorecido pelo desenvolvimento e uso de um vasto grupo de antibióticos (i. e., antibacterianos), antifúngicos e antivirais. Esses períodos prolongados de sobrevivência dos pacientes imunocomprometidos representam intervalos de tempo suficientes para a progressão de lesões pré-malignas que estavam latentes nesses indivíduos, avançando para um estado clinicamente aparente.

Milhares de pacientes transplantados desenvolveram uma variedade de tumores sólidos e hematopoiéticos nas duas últimas décadas. Como discutido anteriormente, uma pequena parcela desses tumores são originados de células metastáticas provenientes dos doadores, que escaparam ao processo de detecção durante o transplante, se multiplicando de maneira agressiva no organismo dos receptores. Esses tumores parecem ser de origem alogênica (i. e., do órgão do doador), de acordo com a análise dos marcadores genéticos compartilhados por eles. Entretanto, os tumores produzidos por células transplantadas

não fornecem dados adicionais que ajudem a esclarecer se tumores de *origem endógena* (i. e., tumores autóctones) crescem com maior frequência em pacientes imunocomprometidos.

Na realidade, muitos tumores autóctones têm sido observados em pacientes com imunossupressão. Um estudo australiano acompanhou pacientes que receberam transplantes de rim por períodos de até 24 anos depois do procedimento cirúrgico; 72% desses pacientes desenvolveram pelo menos um tipo de câncer. Um estudo similar, nos Estados Unidos, identificou um aumento de 3 a 5 vezes no risco de desenvolvimento de câncer em pacientes transplantados. Pacientes que recebem transplante de fígado comumente desenvolvem novos tumores após cinco anos do procedimento e do início da terapia imunossupressora. O sistema de registro de transplantes de Ohio tem mais de 15 mil casos de neoplasias catalogados em pacientes transplantados.

Os tipos mais comuns de câncer em pacientes transplantados são aqueles associados a infecções virais, compreendendo um aumento de 400 a 500 vezes do risco de desenvolver sarcoma de Kaposi, uma neoplasia de precursores hemangioblásticos das células endoteliais (causado pelo herpesvírus humano 8, HHV-8); um aumento de 28 a 49 vezes no risco de desenvolver doenças linfoproliferativas, incluindo doença de Hodgkin (a maioria delas parece estar relacionada com infecções pelo vírus Epstein-Barr – EBV); um aumento de 100 vezes na incidência de carcinoma vulvar de células escamosas ou carcinoma anal (induzido por papilomavírus, HPV); um aumento de 20 a 38 vezes do risco de carcinomas hepatocelulares (geralmente causado pelos vírus da hepatite B ou C – HBV e HCV); e um risco aumentado de 14 a 16 vezes para o desenvolvimento de carcinomas uterinos *in situ* (também associados a infecções pelo HPV).

Taxas aumentadas de tumores associados a vírus são observadas em pacientes com imunodeficiências congênitas ou HIV-positivos com AIDS. Em conjunto, essas observações mostram de maneira clara que o sistema imune representa uma ferramenta importante contra, pelo menos, 20% dos tumores humanos mundialmente, cujo desenvolvimento está, de forma direta ou indireta relacionado com os vírus mencionados anteriormente.

A efetividade expressiva do sistema imune normal em ativar defesas contra tumores induzidos por vírus é ilustrada pelo fato de que 90% dos adultos do ocidente são infectados pelo vírus potencialmente oncogênico, o Epstein-Barr, embora neoplasias associadas a esse vírus sejam relativamente incomuns na população geral. Para citar um outro exemplo, a introdução de terapia multidroga para suprimir a replicação do HIV resulta na recuperação da competência imunológica em um grande número de pacientes infectados; como consequência, a incidência de novos casos de sarcoma de Kaposi na AIDS diminuiu cerca de 40 vezes.

Esses estudos não determinam os mecanismos precisos pelos quais os tumores associados a vírus podem ser controlados pelo sistema imune. Seria possível propor dois modelos plausíveis a fim de explicar esse controle. (1) O sistema imune é normalmente responsivo na proteção contra vários tipos de infecção viral, independentemente da capacidade desses vírus em causar câncer. Na ausência de um sistema imune completamente funcional, muitos vírus, incluindo aqueles oncogênicos, são capazes de persistir e proliferar por longos períodos no organismo, ao contrário do que em geral acontece com infecções virais, que são rapidamente eliminadas pelo sistema imune. (2) Alternativamente, o sistema imune normal é responsável por reconhecer e eliminar células transformadas por vírus. Em indivíduos imunocomprometidos, essas células podem ser capazes de sobreviver indefinidamente.

Um ou ambos os mecanismos poderiam explicar as taxas bastante aumentadas de tumores induzidos por vírus em pessoas imunocomprometidas. Em pacientes com AIDS, por exemplo, altos níveis circulantes do vírus Epstein-Barr não são comumente observados, enquanto os níveis de células linfóides infectadas pelo vírus em alta atividade de proliferação aumentam dramaticamente, originando linfomas induzidos por vírus. Como con-

seqüência, na AIDS, a eliminação de células infectadas pelo vírus, mais do que o próprio vírus, parece estar comprometida. (No organismo de indivíduos normais infectados com EBV, o que representa 90% da população geral, 5% das células T citotóxicas de longa duração reagem com certos antígenos EBV, indicando que o sistema imune celular normalmente envolve, em grande parte de seus mecanismos, o controle de agentes infecciosos como o EBV – nesse caso, eliminando as células que carregam vírus em proliferação.)

Porém, tumores induzidos por vírus representam apenas uma pequena parte dos tipos de câncer rotineiramente tratados na clínica oncológica. Isso leva a questionar se o sistema imune poderia de fato apresentar defesas contra a maior parte dos tumores humanos (~80%) que não são de origem viral. De fato, um risco aumentado de duas a quatro vezes na incidência de melanomas foi encontrado entre adultos transplantados, enquanto um aumento de três vezes foi observado no número de sarcomas não-Kaposi em relação à população geral. Uma população de pacientes que receberam transplante de coração apresentou uma elevação de 25 vezes no risco de carcinomas de pulmão. Registros de pacientes transplantados na Austrália, Nova Zelândia e Escandinávia revelaram taxas elevadas de carcinomas de cólon, pulmão, bexiga e rim, bem como de tumores do sistema imune (Tabela 15.1). As tentativas de associar esses tumores com infecções virais não tiveram sucesso.

Uma outra série de evidências completamente independente confirma o papel das defesas imunes na proteção contra o câncer. Esse estudo é derivado de observações histopatológicas mostrando que tumores humanos freqüentemente têm um número substancial de linfócitos infiltrados na massa tumoral (Figura 15.21). Esses linfócitos que infiltram tumores (TILs) poderiam representar um outro tipo de células do estroma que são recrutadas para a massa tumoral pelas células neoplásicas a fim de permitir a expansão do tumor como um todo, como levantado no capítulo 13. Entretanto, uma explicação alternativa é ainda mais intrigante: estes TILs podem ter sido enviados pelo sistema imune a fim de eliminar as células tumorais.

Observações de um grupo de pacientes com carcinoma ovariano forneceram algumas das evidências mais dramáticas que suportam a segunda alternativa. Esse estudo correlacionou o curso clínico da doença com a presença ou ausência de um número substancial de linfócitos infiltrantes nos tumores. Em um grupo de pacientes que foi submetido à cirurgia para a remoção da massa tumoral seguida de quimioterapia, 74% sobreviveram por mais de cinco anos, nos casos em que os tumores apresentavam um grande número de TILs. Por outro lado, a taxa de sobrevida nos pacientes com tumores que não apresentavam populações significativas de TILs foi de apenas 12%.

Perfis semelhantes foram observados em pacientes com melanoma, infiltrados por uma grande quantidade de linfócitos; esses pacientes tiveram uma sobrevida de 1,5 a 3 vezes maior após o diagnóstico do que aqueles pacientes que possuíam um número limitado de linfócitos infiltrantes. Outras correlações adicionais foram feitas entre a presença desses linfócitos infiltrantes e a sobrevivência de pacientes com carcinoma de mama, vesícula, cólon, próstata e reto. Novamente, tais observações, ainda que dramáticas, são apenas uma proposição e não provam definitivamente que esses linfócitos são agentes importantes responsáveis por frear a progressão tumoral.

Além disso, esses estudos não avaliaram o papel da resposta imune humoral na defesa contra os vários tipos de câncer. Na realidade, alguns estudos demonstraram a presença de anticorpos antitumorais no sangue de pacientes com vários tipos de câncer; a presença desses anticorpos sugere claramente a ocorrência de algum tipo de imunovigilância. Contudo, mais uma vez, não está claro se esses anticorpos contribuem para eliminar as células tumorais do organismo.

Finalmente, a maior parte das conclusões que suportam a teoria da imunovigilância é oriunda de relatos, alguns deles já mencionados, mostrando que as células tumorais empregam

Tabela 15.1 Incidência de câncer em pacientes transplantados imunossuprimidos^a

Sítio do câncer	Nº de casos observados	Nº de casos esperados ^b	Taxa observado/esperado
Pele sem melanoma	127	5,1	24,7
Tireóide, outros endócrinos	30	2,1	14,3
Boca, língua, lábio	22	1,6	13,8
Cérvice, vulva e vagina	39	3,6	10,8
Linfoma não-Hodgkin	25	2,4	10,3
Rim, ureter	32	3,5	9,1
Bexiga	26	4,7	5,5
Colorretal	38	10,5	3,6
Pulmão	30	12,5	2,4
Cérebro	10	4,1	2,4
Próstata	11	5,2	2,1
Melanoma	7	4,1	1,7
Mama	15	13,6	1,1

^aDados extraídos de S.A. Birkeland, H.H. Storm, L.U. Mamm et al., *Int. J. Cancer* 60:183-189, 1995, como adaptados por J. Peto, *Nature* 411:390-395, 2001.

^bEstes números representam os números de casos dos vários tumores esperados em uma população com a idade pareada em um mesmo período.

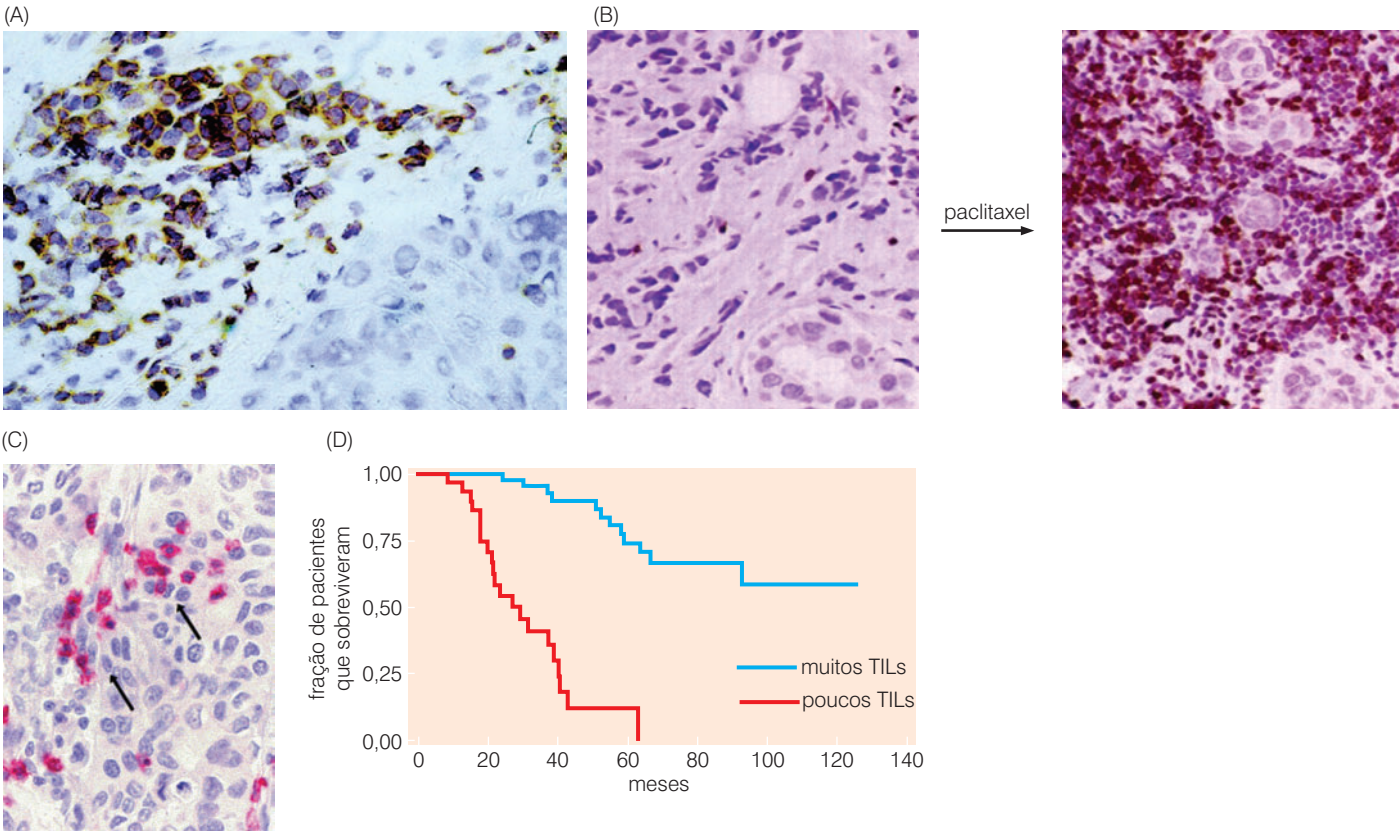


Figura 15.21 Linfócitos infiltrantes de tumores (A) Esta imunocoloração de um carcinoma oral revela linfócitos infiltrantes de tumor (TILs; *marrom*) que são abundantes em certas áreas do tumor e foram detectados com um anticorpo que reconhece o antígeno CD3 expresso pelos linfócitos T. Caracterizações mais detalhadas mostraram subtipos de linfócitos T entre essas células (*não-mostrado*). (B) Esta imunomarcagem demonstra que TILs, detectados novamente com um anticorpo anti-CD3 (*violeta-escuro*), são relativamente raros em um tumor de mama não-tratado (*esquerda*), mas se tornam abundantes em áreas do tumor após a quimioterapia com a droga quimioterápica paclitaxel (*direita*). (C) TILs são frequentemente encontrados em carcinoma invasivo de células não-pequenas de pulmão (NSCLCs; *setas*). Aqui, a expressão do antígeno CD8 (*cor-de-rosa escuro*) indica que estas células são principalmente linfócitos T citotóxicos (CTL, T_C). (D) O prognóstico clínico de um

conjunto de pacientes com carcinoma de ovário foi afetado dramaticamente pelo fato de os tumores apresentarem ou não concentrações significativas de TILs. Como mostrado por essa curva de Kaplan-Meier, a proporção de pacientes que sobreviveram depois do diagnóstico inicial (*ordenada*) é mostrada *versus* os meses de sobrevivência (*abscissa*). Aqueles pacientes cujos tumores apresentaram altos níveis de TILs (*linha azul*) se comportaram significativamente melhor do que aqueles cujos tumores não tinham concentrações significativas de TILs (*linha vermelha*). (A, extraída de T.E. Reichert, L. Strauss, E.M. Wagner et al., *Clin. Cancer Res.* 8 : 3137-3145, 2002 ; B, extraída de S. Demaria, M.D. Volm, R.L. Shapiro et al., *Clin. Cancer Res.* 7:3025-3030, 2001; C, extraída de A. Trojan, M. Urosevic, R. Dummer et al., *Lung Cancer* 44:143-147, 2004 ; D, adaptada de L. Zhang, J.R. Conejo-Garcia, D. Katsaros et al., *N. Engl. J. Med.* 348:203-213, 2003.)

várias estratégias para escapar da detecção e eliminação pelo sistema imune. Uma discussão detalhada acerca dos mecanismos de *imunoevasão* será apresentada mais adiante. No momento, é suficiente considerar que as células tumorais ativam vários mecanismos para reduzir a resposta imunológica, de forma que possam escapar do sistema imunológico. Embora também sejam correlações, essas observações com frequência representam evidências convincentes de que a imunovigilância e a imunoevasão constituem parte de uma dinâmica importante na progressão tumoral.

15.10 Diferenças sutis entre tecidos normais e tecidos neoplásicos podem permitir que o sistema imune seja capaz de distingui-los

O sucesso das defesas imunes contra agentes infecciosos depende da capacidade de reconhecer esses invasores como estranhos ao organismo humano. Agentes infecciosos invariavelmente apresentam moléculas que demonstram a sua origem, provocando o ataque por células especializadas do sistema imune inato e adaptativo. Tipicamente, essas moléculas estranhas contêm seqüências de oligopeptídeos que são reconhecidas como diferentes daquelas existentes nas proteínas nativas do próprio organismo.

Ao mesmo tempo, um sistema imune perfeitamente funcional não detecta proteínas e seqüências de aminoácidos que sejam nativas ao organismo – um reflexo da tolerância imunológica discutida anteriormente. O fenômeno de tolerância imunológica complica em muito as tentativas de compreender como o sistema imune seria capaz de fazer a defesa contra tumores espontâneos. Em última instância, o sucesso dessas defesas depende de um ponto importante: o sistema imune pode reconhecer células tumorais que estão em crescimento no organismo como sendo estranhas, mesmo sendo elas nativas do corpo?

A resposta a essa questão é bastante óbvia. A vasta maioria das proteínas que são expressas pelos tumores é claramente normal, tanto na estrutura quanto nos níveis de expressão. Todavia, dentre mais de 20.000 proteínas expressas por tumores, existem espécies distintas (ou variantes) que são produzidas em um ou outro tipo de câncer, certamente em pequeno número e por apenas algumas células tumorais, mas que não estão presentes nos tecidos normais. Essas diferenças estruturais, ainda que sutis, são percebidas como estranhas, podendo iniciar uma resposta imune antígenoica vigorosa.

Um exemplo simples de antígeno tumoral pode ser observado com as oncoproteínas Ras, as quais são geradas por substituições de aminoácidos nos resíduos 12, 13 ou 61 de quatro subtipos de proteínas Ras, presentes em células normais. Essas oncoproteínas exibem estruturas químicas claramente alteradas, sendo que a seqüência de aminoácidos em uma oncoproteína Ras, que compreende e inclui um resíduo alterado, pode, certamente, constituir um antígeno oligopeptídico capaz de evocar respostas imunes. De maneira similar, os numerosos alelos mutantes do gene supressor de tumores *p53* podem apresentar substituições de aminoácidos que produzem versões alteradas dessa proteína, sendo imunogênicas em quase 50% dos tumores humanos que expressam a proteína *p53*.

Outros exemplos adicionais de proteínas produzidas especificamente por tumores compreendem translocações cromossômicas para proteínas de fusão codificadas por pares de genes previamente não-relacionados. Essas translocações são encontradas freqüentemente em neoplasias hematopoiéticas. Pode-se destacar, por exemplo, a proteína de fusão Bcr-Abl, que é encontrada em células de leucemia mielógenosa crônica (CML) (Seção 4.6). Enquanto a maior parte da seqüência de aminoácidos das proteínas de fusão é estruturalmente idêntica às seqüências das duas proteínas (Bcr e Abl) de células normais, a pequena região onde essas duas proteínas se juntam constitui uma nova seqüência de aminoácidos que pode ser potencialmente reconhecida como estranha, sendo, portanto, imunogênica.

Por causa da instabilidade genética das células tumorais (Capítulo 12) e do grande número de ciclos celulares sucessivos pelos quais as linhagens celulares passam durante os vários estágios da progressão tumoral (veja a Figura 10.5), alelos mutantes que codificam proteínas estruturalmente alteradas podem estar presentes com alta frequência nos genomas dessas células. A maior parte desses alelos pode não estar relacionada com a velocidade da proliferação tumoral, constituindo intermediários da instabilidade genômica, embora as proteínas produzidas por esses alelos mutantes possam ser altamente imunogênicas – uma questão que será rediscutida mais tarde.

O melanoma pode fornecer um bom exemplo de um antígeno que constitui um intermediário da progressão tumoral. Ele expressa uma triosefosfato isomerase mutante (uma enzima-chave da glicólise). Considerando a função normal dessa proteína, sua estrutura mutante não parece exercer qualquer papel na patogênese tumoral. O processamento intracelular dessa proteína produz um antígeno oligopeptídico mutante capaz de se ligar a proteínas MHC de classe II com uma afinidade cinco vezes maior do que o oligopeptídeo normal. Essa ligação resulta em um aumento expressivo da apresentação antigênica e de toda imunogenicidade do melanoma.

De forma geral, as tentativas a fim de prever a imunogenicidade de várias proteínas e sua capacidade relativa de produzir respostas imunes consistentes é altamente desafiante. Muitas proteínas que apresentam estruturas distintas podem ser ignoradas pelo sistema imune em comparação com as proteínas celulares normais. Outras podem ser simplesmente toleradas, porque, apesar de serem estruturalmente distintas das proteínas normais, elas podem estar presentes em níveis baixos demais para que haja ativação do sistema imune. A proteína Ras pode exemplificar as duas situações: as oncoproteínas Ras mutantes encontradas em muitos tumores humanos apresentam uma estrutura tridimensional próxima da normalidade e, como as proteínas Ras normais, estão presentes em concentrações relativamente baixas em células tumorais. Além disso, por causa da sequência de aminoácidos, certos oligopeptídeos mutantes podem não ser prontamente ligados pelas moléculas competentes do sistema MHC dos pacientes (veja a Figura 15.7).

Predizer a imunogenicidade também pode ser complicado pelo fato de que não se compreende totalmente as regras que regem o estabelecimento de tolerância no sistema imune em desenvolvimento. Grande parte dessa tolerância é obtida no timo ou na medula óssea durante o desenvolvimento embrionário e nas fases pós-natais precoces, nas quais os linfócitos B e T que adquirem reatividade imunológica a proteínas normais são eliminados ou funcionalmente inativados. Mais tarde, os linfócitos circulantes no organismo desenvolvem “tolerância periférica” a proteínas encontradas em sítios distantes do timo ou da medula óssea. Novamente, a tolerância é estabelecida pela eliminação de linfócitos que reconhecem antígenos teciduais normais. Além disso, as células T regulatórias descritas na Seção 15.6 são conhecidas por suprimir as ações dos linfócitos que escapam da eliminação por outros mecanismos.

O que poderia acontecer se várias populações de linfócitos em desenvolvimento nunca fossem expostas a certas proteínas normais? Algumas proteínas podem ser expressas apenas transitoriamente em estágios específicos do desenvolvimento embrionário inicial, em um período anterior àquele em que a tolerância imunológica é desenvolvida. Outras proteínas, como sugerido anteriormente, podem estar presentes em concentrações muito baixas, sendo que as populações de linfócitos em desenvolvimento raramente vão percebê-las, não eliminando as poucas células capazes de reconhecer essas proteínas pouco expressas. Ademais, outras proteínas podem ser expressas em alguns tecidos “imunoprivilegiados” como o cérebro, em que a vigilância efetiva do sistema imune é usualmente bloqueada por mecanismos complexos que constituem a “barreira hematoencefálica”. Essa proteção também pode ocorrer no testículo, que parece ser protegido pela monitoração rotineira realizada por células do sistema imune.

Em suma, uma variedade de mecanismos distintos pode prevenir o desenvolvimento de tolerância contra certas proteínas celulares normais. Entretanto, se uma dessas proteínas for ex-

pressa em níveis muito elevados por células tumorais, essas falhas no processo de tolerância imunológica podem permitir o reconhecimento imunológico de tais células. Por exemplo, a subunidade catalítica da haloenzima telomerase, hTERT, não é expressa em níveis detectáveis em células humanas normais, embora possa ser encontrada em níveis elevados em 85 a 90 % dos tumores humanos (veja a Seção 10.6); uma percentagem significativa de pacientes com câncer de fígado estudados no Japão mostra níveis detectáveis de anticorpos contra hTERT, que aumenta de forma equilibrada durante a progressão tumoral. (Não está claro se esses anticorpos anti-hTERT têm qualquer efeito sobre o curso da progressão tumoral em tais pacientes.)

De maneira similar, em muitos carcinomas de mama, o receptor HER2/Neu é frequentemente expresso em níveis muito mais elevados (10 a 20 vezes) do que os observados em tecidos epiteliais normais (Figura 4.6); novamente a reatividade imune pode ser ativada contra essa proteína. Alguns melanomas humanos superexpressam carboidratos de superfície, chamados de glangliosídeos, que também podem ser capazes de ativar respostas imunes. A expressão de um desses carboidratos, denominado GD3, é algumas vezes significativamente maior em células de melanomas, em comparação com seus precursores celulares normais, os melanócitos. Em cada um desses casos, as proteínas superexpressas ou as moléculas de carboidratos levam à ativação do sistema imune, como poderia ser esperado.

Imagine que uma célula tumoral expressasse uma proteína embrionária que não ocorre em tecidos normais adultos – uma situação comumente vista em muitos tipos de tumores humanos. Essas proteínas embrionárias poderiam representar antígenos potentes quando expressas em tecidos adultos. Por meio de outro mecanismo – os *splicings* alternativos de precursores do mRNA – versões estruturalmente diferentes de proteínas normais adultas estariam presentes em células tumorais, nunca tendo sido apresentadas previamente ao sistema imune.

Em conjunto, esses exemplos indicam que defesas imunológicas expressivas poderiam ser ativadas contra células tumorais que expressam proteínas em localizações anatômicas ectópicas, durante estágios de desenvolvimento em que não deveriam ser encontradas ou em níveis elevados acima dos normais. Ocasionalmente, essas respostas imunológicas contra tumores, as quais são resultantes de uma quebra de tolerância, são algumas vezes contraproduativas para os pacientes com câncer, pois podem ocasionar certos tipos de desordens auto-imunes estranhas.

15.11 O reconhecimento imune de tumores pode ser retardado até estágios avançados da progressão tumoral

Quando a resposta imune antitumoral se torna ativa durante os vários estágios da progressão tumoral? Alguns imunologistas que estudam o câncer acreditam que, no início da progressão tumoral, os aglomerados de células tumorais podem ser muito pequenos para serem reconhecidos pelo sistema imune. Assim, eles propõem que o reconhecimento pelo sistema imune pode ocorrer apenas mais tarde, quando os tumores se tornam grandes o suficiente e adquirem a capacidade de invadir tecidos adjacentes.

As evidências indicativas de uma relação entre a invasibilidade das células tumorais e a iniciação do reconhecimento imune dessas células não são definitivas. Como foi visto nos dois capítulos anteriores, o processo de invasão envolve, dentre outras coisas, o recrutamento de numerosos tipos celulares que, em conjunto, originam uma resposta inflamatória. Essa resposta inflamatória é, por sua vez, intimamente conectada com os processos que normalmente contribuem para o reparo tecidual.

É possível imaginar que o processo de reparo tecidual envolve dois processos biológicos distintos. Primeiro, o tecido lesado deve ser reconstruído; isso envolve a ativação de fibroblastos do estroma, etapas de transição epiteliais-mesenquimais reversíveis de células epiteliais (EMTs)

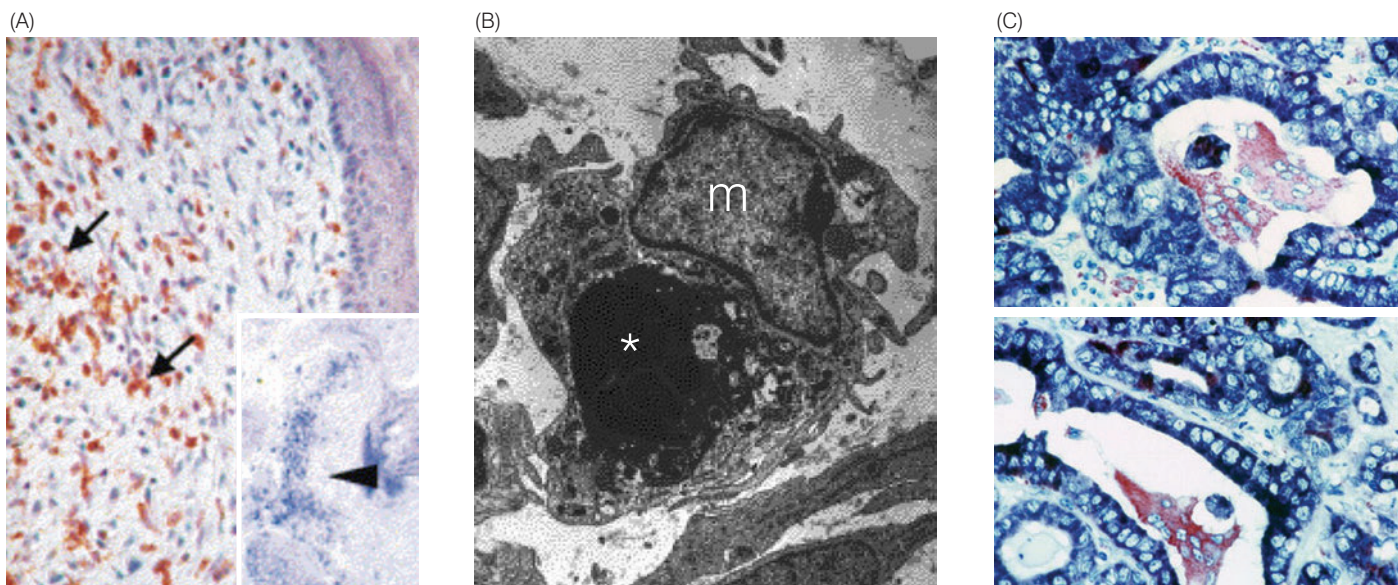
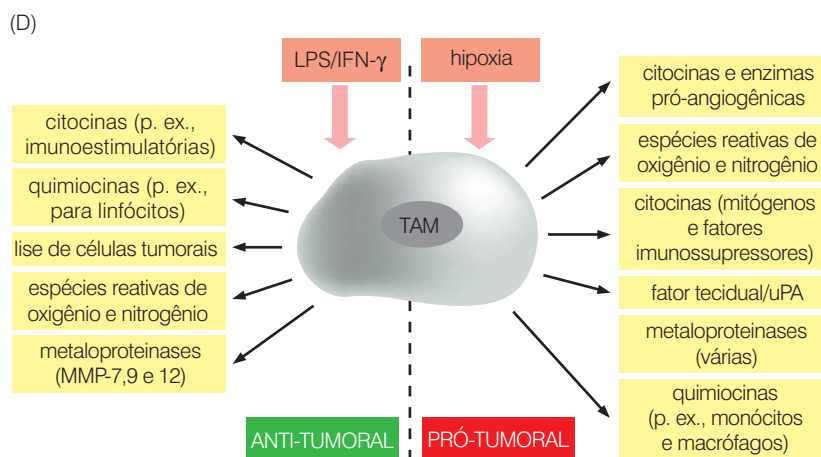


Figura 15.22 Papéis múltiplos de macrófagos. Macrófagos exercem papéis fundamentais na promoção de cicatrização e na progressão tumoral; ao mesmo tempo, eles agem como agentes do sistema imune para apresentar antígenos tumorais e para eliminar células tumorais. Parece que estas diferentes funções são realizadas por diferentes subtipos de macrófagos. (A) Neste sítio de reparo de uma lesão de pele em um camundongo, macrófagos (*marrom*) são detectados em abundância (*setas*) através de um anticorpo que reconhece o antígeno específico de macrófagos F4/80 e o marcador de receptor c-Fms (*seta, parte interna*). (B) Microscopia eletrônica de transmissão revela que um macrófago está envolvido com os corpos fagocitados de células apoptóticas (*asterisco, parte escura*) no centro de um sítio de cicatrização. (C) Dois macrófagos (*cor-de-rosa, acima, painel inferior*) são vistos no início da fagocitose de células tumorais no lúmen dos ductos de um carcinoma papilar da tireóide. (D) Macrófagos podem ser ativados por diversos sinais, tais como interferon- γ (IFN- γ) e lipopolissacarídeo bacteriano (LPS), sendo o último utilizado como adjuvante para potencializar a resposta imune. Uma vez ativados, eles podem funcionar como apresentadores de antígeno para as células-T auxiliares e para induzir a morte tumoral por citotoxicidade celular anticorpo-dependente (ADCC). Agindo de um modo contrário, a hipóxia, bem como uma variedade de sinais fisiológicos liberados pelos tumores (ver Capítulos 13 e 14) ativam os macrófagos e fazem com que eles aumentem a progressão tumoral. (A e B, extraídas de P. Martin, D. D' Souza, J. Martin et al., *Curr Biol.* 13: 1122-1128, 2003; C, extraída de A. Fiumara, A. Belfiore, G. Russo et al., *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82:1615-1620, 1997; D, extraído de L. Bingle, N.J. Brown e C.E. Lewis, *J. Pathol.* 196:254-265, 2002).



e mecanismos de sinalização complexos que governam a angiogênese (Capítulo 13). Segundo, o reparo tecidual deve incluir a mobilização das defesas imunes a fim de garantir que as áreas lesadas, que estão sem as barreiras físicas normais contra infecções, fiquem livres de bactérias e fungos.

Durante o curso da evolução, certas classes de células imunes foram capacitadas a mediar ambos os tipos de respostas biológicas. Assim, os macrófagos são responsáveis por liberar proteases que facilitam a remodelação tecidual, além de fatores que promovem a angiogênese – dois aspectos da reconstrução tecidual (Seção 13.5). Eles são responsáveis pela remoção dos fragmentos celulares nos sítios da lesão tecidual (Figura 15.22A e B). Ao mesmo tempo, os macrófagos são capazes de fagocitar bactérias e fungos; por exercerem o papel de células apresentadoras de antígeno profissionais (APCs), os macrófagos podem processar e apresentar antígenos para células T auxiliares (T_H). Similarmente, macrófagos associados a tumores (TAMs) podem fagocitar (ingerir) células tumorais ou fragmentos dessas células (Figura 15.22C). Alguns estudos indicam que macrófagos que tenham ingerido antígenos derivados de tumores produzam níveis bastante elevados do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), o principal controlador de angiogênese.

O fato de que essas diversas atividades residam em um único tipo celular (ou um grupo de células relacionadas) poderia ser sugestivo de que a invasibilidade tumoral, a inflamação, a angiogênese e a resposta imune são processos frequentemente interconectados. Essa interco-

nexão pode também ter uma explicação anatômica: à medida que células epiteliais neoplásicas permanecem no interior da membrana basal, elas estão bastante protegidas de células imunes que estão continuamente ativas no outro lado dessa membrana. Entretanto, uma vez que essas células ultrapassam a membrana basal, as células tumorais podem atrair a atenção de imunócitos, inicialmente células matadoras naturais (NK); as células matadoras naturais podem ativar uma segunda onda de respostas imunes mediadas por macrófagos e por linfócitos da resposta imune adaptativa.

Embora plausível, essa seqüência de eventos ainda precisa ser demonstrada experimentalmente. Além disso, há indicações de que mecanismos de imunovigilância possam ser ativados antes que as células epiteliais se tornem invasivas e ultrapassem a membrana basal. Por exemplo, em alguns tecidos epiteliais, como do trato gastrointestinal, há evidências da existência de linfócitos intra-epiteliais (IELs); esses imunócitos são responsáveis por monitorar populações de células epiteliais acerca da presença de patógenos invasores. Esses IELs poderiam ainda servir como sentinelas de resposta rápida, permitindo ao sistema imune detectar células neoplásicas antes de elas se tornarem invasivas. Além disso, como visto na Figura 15.22C, macrófagos podem ingerir células tumorais do lado epitelial da membrana basal (nesse caso, no lúmen de um ducto formado pelo adenocarcinoma). Ainda não está claro como esses macrófagos, uma vez que tenham ingerido as células tumorais, migram para os linfonodos e apresentam os antígenos associados às células tumorais para células T auxiliares, iniciando assim respostas imunes humorais e celulares adaptativas.

15.12 Antígenos de transplantação específicos de tumores frequentemente provocam uma resposta imune potente

Ao passo que células tumorais realmente são capazes de ativar respostas imunes adaptativas, essas respostas deveriam ser traçadas por meio de antígenos específicos apresentados pelas células tumorais. Imunologistas de tumores classificaram essas proteínas antigênicas em duas categorias principais – antígenos de transplantação específicos de tumores (TSTAs) e antígenos de transplantação associados a tumores (TATAs; Tabela 15.2). (Uma vez que experimentos com transplante de tumores não podem ser realizados em humanos, as proteínas humanas análogas são chamadas de TSAs e TAAs.)

Por definição, os TSTAs são *específicos* a um tumor ou tipo de tumor, e, assim, não estão presentes no repertório de proteínas e oligopeptídeos normalmente expressos no organismo. TSTAs podem ser codificados, por exemplo, por genomas virais ou por alelos mutados somaticamente (como *ras*, *p53* ou *bcr-abl*), surgindo durante a progressão tumoral. Porque são estruturas novas, essas proteínas não são suscetíveis aos mecanismos de tolerância adquiridos durante o desenvolvimento normal do sistema imune.

TATAs, por outro lado, são apenas *associados* a células tumorais, e sua expressão não é limitada a tecidos neoplásicos. TATAs representam uma grande classe de proteínas normais, que,

Tabela 15.2 Alguns antígenos associados a tumores e alguns antígenos específicos de tumores e os peptídeos antigênicos reconhecidos por células T humanas

Tumor humano	Proteína	Peptídeo antigênico
Melanoma, carcinoma de esôfago, carcinoma de fígado, NSCLC	MAGE	EADPTGHSY, SAYGEPRKL
Melanoma	tirosinase	MLLAVLYCL, YMNGTMSQV
Carcinoma de cólon	antígeno carcinoembrionário (CEA)	YLSGANLNL
Carcinomas ovarianos e de mama	HER2/Neu	KIFGSLAFL
Carcinoma de cabeça e pescoço	caspase 8	FPSDWCFY
Leucemia mielogenosa crônica (CML)	Bcr-Abl	ATGFKQSSKALQRPVAS
Carcinoma de próstata	antígeno específico da próstata (PSA)	FLTPKKKLQCV, VISNDVCAQV

Extraída de R.A. Goldsby et al., Immunology, 5th Ed., New York: Freeman, 2002 e; B.J. Van den Eynde e P. van der Bruggen, *Curr. Opin. Immunol.* 9:684-693, 1997.

por uma razão ou outra, falharam ao elicitar tolerância completa e, quando expressos por células tumorais, atraem a atenção do sistema imune. O fato de que TATAs são proteínas celulares normais explica a observação de que certos TATAs podem ser expressos durante a progressão de vários tumores independentes de um tipo específico, como um grupo de melanomas.

Como os próprios nomes indicam, a existência dessas duas classes de antígenos pode ser demonstrada por experimentos com transplante de tumores. Por exemplo, lembrando um experimento descrito anteriormente (veja a Figura 15.17), células de sarcoma provenientes da exposição de camundongos ao carcinógeno químico 3-metilcolantreno podem ser introduzidas em um segundo camundongo singênico. As células tumorais multiplicam por várias semanas antes de serem removidas cirurgicamente. Se esse camundongo é então desafiado pela re-inoculação com células tumorais do sarcoma original, com frequência ele irá rejeitar o tumor, bloqueando assim a formação tumoral. Entretanto, se células de um outro sarcoma induzido por 3MC são injetadas nesse camundongo, elas vão originar um tumor.

Tal comportamento indica que as células dos dois sarcomas distintos são antigenicamente distintas, e que as células do primeiro sarcoma carregam um ou mais determinantes antigênicos, capazes de ativar respostas imunes, tornando o camundongo resistente à inoculação subsequente de células derivadas do mesmo sarcoma. Isso sugere que o carcinógeno mutagênico (3MC) que originalmente induziu esses tumores também ocasionou o aparecimento de um ou mais genes celulares mutantes nas células tumorais, cujos produtos funcionaram como TSTAs. Além disso, é possível que cada vez que o 3MC cause a formação de um tumor ocorra a geração de um ou mais TSTAs (Figura 15.23).

A detecção real e a identificação de proteínas que funcionam como TSTAs são experimentalmente desafiante. Considere que um sarcoma induzido por 3MC expresse um TSTA potencialmente antigênico. Consequentemente, o sistema imune de um camundongo transplantado irá responder de forma marcante a esse TSTA, na tentativa de eliminar aquelas células do sarcoma que apresentam altos níveis antigênicos, enquanto as células do tumor que expressam baixos níveis do antígeno serão preservadas. A seleção darwiniana resultante determinará

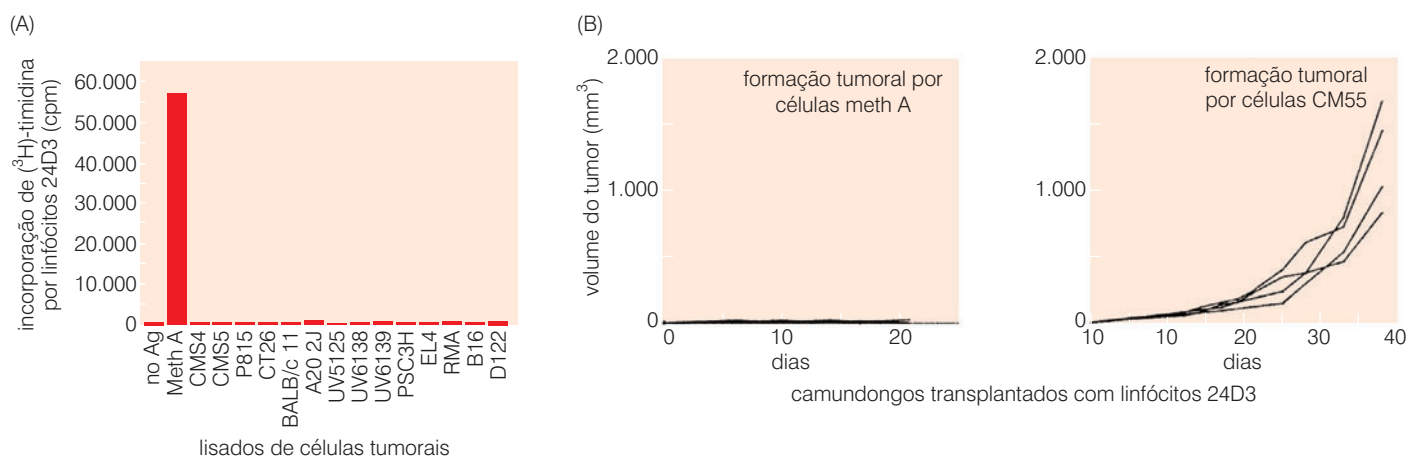


Figura 15.23 Especificidade da expressão antigênica por um fibrossarcoma induzido quimicamente. Camundongos da linhagem BALB/c foram imunizados com lisados de células de uma linhagem de fibrossarcoma Meth A induzido por 3-metilcolantreno. Uma linhagem de linfócitos apresentadores de antígeno, chamada 24D3, foi desenvolvida a partir desses camundongos. (A) Como determinado por sua incorporação de ^3H -timidina, a proliferação desses linfócitos em cultura foi estimulada pela adição de lisados celulares de Meth A (2ª coluna). Entretanto, lisados preparados a partir de outras 14 linhagens de células tumorais, incluindo outros sarcomas induzidos por metilcolantreno, carcinomas de pele de células escamosas induzidos

por UV, linfomas, um melanoma e um carcinoma de pulmão não foram capazes de estimular a proliferação desses linfócitos (*canais remanescentes*). Na ausência do antígeno (1ª canal), nenhuma proliferação foi observada. (B) Quando a população clonal desses linfócitos 24D3 foi introduzida nos hospedeiros BALB/c, a formação de tumores pela injeção subsequente de células de fibrossarcoma Meth A foi totalmente bloqueada (*painel esquerdo*). Contudo, a formação de tumores por uma linhagem não-relacionada de fibrossarcoma, chamada de CMS5, não foi alterada pela presença desses linfócitos (*painel direito*). (Extraída de T. Matsutake e P.K. Srivastava, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:3992-3997, 2001.)

que apenas aquelas células tumorais e as suas descendentes que expressem baixos níveis de TSTA sobreviverão o tempo suficiente para que sejam estudadas, complicando o isolamento bioquímico e a identificação dessa proteína TSTA.

Nos últimos anos, vários dos genes que codificam TSTAs induzidos por 3-MC foram isolados por meio de técnicas de clonagem de genes. Em uma das abordagens utilizadas, os oligopeptídeos ligados a moléculas MHC de classe I da superfície das células transformadas e que serviram como alvos de reconhecimento imunológico foram obtidos a partir de moléculas MHC, purificadas e submetidas ao sequenciamento de aminoácidos. As sequências de aminoácidos resultantes foram então usadas para prever as sequências dos genes, o que tornou possível a clonagem destes. Análises de sequência dos genes que codificam TSTAs clonados de tais tumores mostraram a ocorrência de mutações pontuais a partir de genes normais que codificam várias proteínas celulares, nenhuma delas envolvida em qualquer via óbvia de transformação tumoral.

Essas observações sugerem que, durante a progressão da carcinogênese, o carcinógeno 3-MC, um conhecido agente mutagênico (Seção 12.6), produz a mutação de um proto-oncogene (frequentemente o gene *K-ras*) nas células-alvo e genes adicionais que, como alelos mutantes, apresentam TSTAs; os últimos genes são atingidos de forma aleatória – moléculas não-relacionadas que não exercem qualquer efeito causal nos mecanismos de tumorigênese, mas que podem ter sido afetadas pelas altas doses do carcinógeno mutagênico usado para a indução tumoral.

De forma importante, o comportamento dos TSTAs induzidos quimicamente é de certa forma distinto daqueles resultantes de tumores causados por infecções virais. Por exemplo, o vírus SV40 pode ser usado para induzir sarcoma em camundongos. A remoção subsequente vai resultar na imunização do camundongo contra outras células tumorais derivadas desse tipo de sarcoma em particular, bem como de outros tumores induzidos pelo vírus SV40. Nesse caso, ocorre o estabelecimento de **imunidade cruzada**, na qual todas as células tumorais induzidas por SV40 parecem compartilhar um ou mais TSTAs. O fato é que o TSTA dominante responsável pela imunidade cruzada é uma proteína familiar: a oncoproteína T codificada por vírus, a qual é significativamente expressa em todas as células transformadas pelo vírus SV40. Isso contrasta com o comportamento de um grupo de tumores induzidos por 3-MC, em que cada tumor expressa seu(s) próprio(s) TSTA(s).

Observações como essas levam a questionar se mecanismos similares são ativados na tumorigênese humana. Assim, seria possível que os genomas altamente mutáveis de células tumorais (Capítulo 12) originassem proteínas antigênicas mutantes como intermediários causais da mutagênese que governa progressão tumoral? Ou, ainda, seriam os TSTAs induzidos por 3-MC artefatos produzidos pelas altas doses de carcinógenos mutagênicos utilizadas em muitos experimentos de tumorigênese, que não refletem de forma acurada os processos mutagênicos que determinam tumores humanos?

15.13 Antígenos de transplantação associados a tumores também podem ativar a imunidade antitumoral

Como descrito anteriormente, antígenos de transplantação associados a tumores (TATAs) representam proteínas celulares normais que, por uma razão ou outra, não foram capazes de induzir tolerância. Quando essas proteínas normais são expressas por tumores, elas evocam uma resposta imune mensurável, que frequentemente envolve ambos os componentes, humoral e celular, do sistema imune.

Por uma série de razões, a antigenicidade dos melanomas tem sido estudada com mais intensidade do que todos os outros tumores humanos. A maior parte dos seus mecanismos de antigenicidade são relacionados a determinados TATAs. Células de melanoma podem superexpressar certas proteínas que estão presentes em melanócitos normais precursores, embora

Barra lateral 15.1 Instabilidade de microssatélites frequentemente resulta em tumores mais imunogênicos Como descrito na Seção 12.4, defeitos na maquinaria de reparos de erros no DNA criam a condição de instabilidade de microssatélites (MIN), que resulta em mutações que se acumulam em centenas, possivelmente milhares, de genes celulares dos genomas das células tumorais. Dentre outras consequências, essas mutações geram alterações nas fases de leitura de muitos desses genes. Esses alelos mutantes resultantes frequentemente codificam novas sequências de aminoácidos, algumas vezes chamados de “peptídeos com mudança de fase”, alguns dos quais podem funcionar como potentes antígenos tumor-específicos.

Essa lógica prevê que 15% dos tumores colorretais humanos que exibem instabilidade microssatélite deveriam interagir com o sistema imune do hospedeiro diferentemente da maioria dos tumores colorretais que não apresentam MIN e, em vez disso, exibem instabilidade cromossômica (CIN). De fato, os tumores MIN mostram um grau marcadamente mais elevado de linfócitos infiltrantes (TILs) e um nível mais baixo de metástases. Além disso, a apresentação de antígenos pelas proteínas MHC de classe I está mais comumente comprometida do que nos tumores colorretais com instabilidade cromossômica (60% vs. 30%), sugerindo que os tumores MIN estão sob grande pressão para escapar da eliminação pelos vários componentes do sistema imune e que eles utilizam manobras imunoevasivas para bloquear a apresentação de antígenos pelas suas proteínas MHC de classe I. Analisadas em conjunto, essas observações sugerem que a MIN, que capacita alguns tumores colorretais a evoluir mais rapidamente, pode definir um “preço” para a imunogenicidade desses tumores.

em níveis muito baixos. Essas proteínas linhagem-específicas são algumas vezes chamadas de *antígenos de diferenciação*, o que implica que sua expressão é um vestígio do programa de diferenciação responsável por regular previamente o comportamento dos precursores celulares normais. Dentre os TATAs de melanoma estão transferrina, tirosinase (Figura 15.24A), gp100, Melan-A/Mart-1 e gp75.

A expressão desses antígenos de diferenciação pelas células de melanoma frequentemente provoca uma resposta marcante do sistema imune, que resulta em uma forma muito peculiar de doença auto-imune – o **vítiligo** – a despigmentação de grandes áreas da pele, observada em alguns pacientes com melanoma (Figura 15.25). Essa despigmentação é uma resposta específica à presença de um melanoma. Por exemplo, quando 104 pacientes com carcinoma renal foram tratados com a citocina interleucina-2 (IL-2), a fim de aumentar suas respostas imunes antitumorais, nenhum deles desenvolveu vítiligo; por outro lado, de 74 pacientes com melanoma tratados da mesma forma, 11 desenvolveram vítiligo.

Nesses pacientes com melanoma, é claro que a resposta imune ativada por TATAs do tumor leva, por consequência, ao ataque e destruição de melanócitos normais, os quais também expressam esses antígenos. Esse tipo de vítiligo é primariamente análogo às síndromes para-neoplásicas discutidas previamente, nas quais a expressão de proteínas celulares por tumores resulta na destruição de tecidos normais que também parecem expressar essas proteínas. De forma significativa, pacientes com melanoma que apresentam vítiligo em geral sobrevivem por períodos mais longos do que aqueles que não apresentam – isso sugere que seus sistemas imunes são efetivos no controle dos melanomas, ao menos por um período. (Por exemplo, em uma grande população de pacientes com melanoma descrita em 1987, 75% sobreviveram após 5 anos depois do diagnóstico; dentre o subgrupo destes pacientes que tiveram vítiligo, 86% sobreviveram durante este período de tempo.)

A antigenicidade de células de melanoma humano pode também estar associada à expressão de outra subclasse maior de TATAs, os antígenos **oncofetais** – literalmente são antígenos expressos durante a embriogênese e novamente por tumores. Dentre esses, estão os antígenos chamados de antígenos de câncer de linhagens germinativas ou de câncer de testículo (CT), uma analogia a sua expressão normal por células germinativas do testículo ou do ovário no período fetal. Os genes

Figura 15.24 Proteínas normais expressas como antígenos associados a tumores sobre células de melanoma (A) A enzima tirosinase, a qual está envolvida na produção de pigmentos em melanócitos e melanomas, é detectada aqui nos melanócitos da pele (*vermelho*, localizado ligeiramente acima da membrana basal na pele) por meio do uso de um anticorpo monoclonal; ela não é detectada em outros tecidos normais. Sua expressão por células de melanoma pode fazer com que se tornem imunogênicas, sendo alvos de eliminação para linfócitos citotóxicos. (B) Aqui, a espermatogônia nos testículos foi corada com um anticorpo monoclonal contra o antígeno MAGE-1; normalmente esse antígeno é visto apenas na placenta. Sua expressão foi detectada em uma variedade de tipos de tumores humanos e tem sido estudada em detalhe em melanomas, porque é frequentemente imunogênica quando expressa por esses tumores. (A, extraída de Y.T. Chen, E. Stockert, S. Tsang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:8125-8129, 1995; B, extraída de J.C. Cheville e P.C. Roche, *Mod. Pathol.*, 12: 974-978, 1999.)

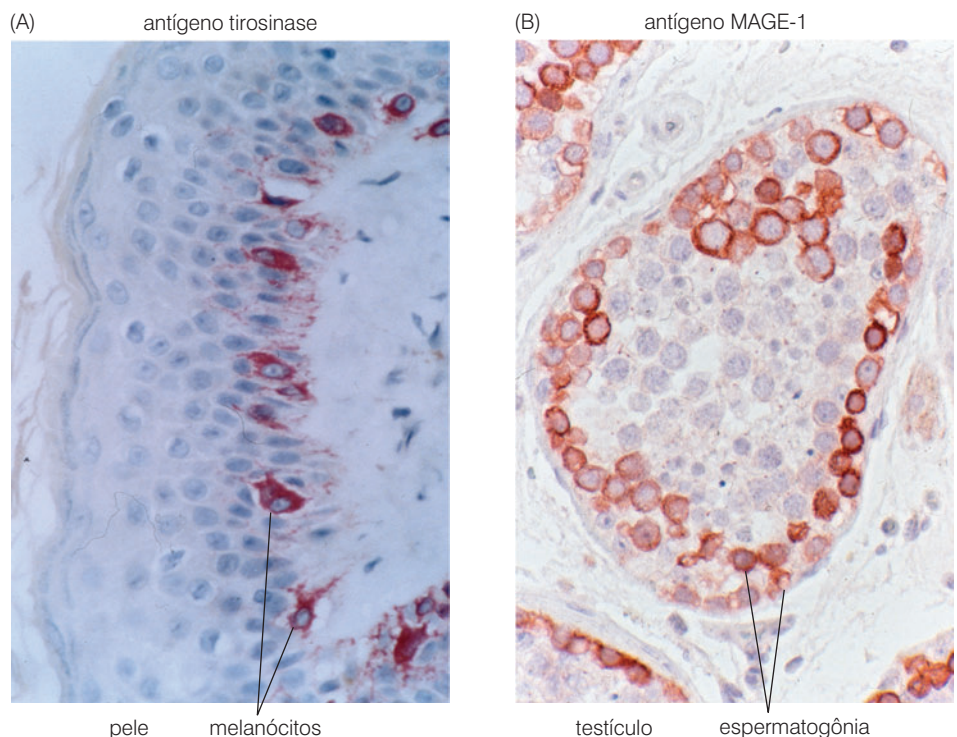




Figura 15.25 Despigmentação auto-imune provocada por melanomas. O paciente com melanoma mostrado aqui, que possuía a pele escura antes do início do melanoma, teve uma perda quase total da pigmentação da pele, exceto por várias áreas isoladas (face, embaixo do braço), devido ao ataque auto-imune iniciado pelas células do melanoma. A condição de perda de pigmento, conhecida como *vitiligo*, é freqüentemente correlacionada com uma sobrevivência maior dos pacientes com melanoma. (Cortesia de A.N. Houghton.)

para vários desses antígenos, como MAGE-1 (Figura 15.24B), MAGE-3, BAGE, GAGE-1 e GAGE-2 já foram clonados. Até 2003, 44 genes ou famílias de genes codificando um total de 89 antígenos distintos de câncer de testículo foram identificados.

Em adição, parece que a ausência de respostas imunes contra esses antígenos em homens está relacionada ao fato de que vários outros tipos celulares do testículo não expressam moléculas MHC de classe I, prevenindo assim a apresentação dos seus conteúdos internos ao sistema imune. (Obviamente, mulheres não expressam essas proteínas em nenhum dos seus tecidos.) Ademais, a expressão por células do testículo de níveis significativos de FasL, o ligante para o receptor de morte Fas (Seção 9.14), pode também ser usada por esse tipo de célula, a fim de manter linfócitos T e outros imunócitos inativos, garantindo proteção contra a ativação do sistema imune. Isso poderia explicar por que a expressão dessas proteínas de células germinativas em sítios ectópicos normalmente desencadeia uma resposta imunológica marcante.

A conclusão de que a tolerância para muitas das proteínas desses melanomas possa ser contornada (“quebrada”, na linguagem dos imunologistas) conduz a uma estratégia simples e óbvia da terapia anticâncer, na qual esses antígenos são tratados como se eles fossem produtos de agentes invasores, como vírus ou bactérias. Essas concepções originaram diversas tentativas a fim de imunizar camundongos ou humanos com uma vacina contendo uma ou outra dessas proteínas antigênicas.

Por exemplo, algumas células de melanoma superexpressam ($100 \times$ mais) o receptor normal da transferrina, uma proteína que está envolvida no metabolismo e recaptação de ferro em muitos tipos celulares no organismo. Camundongos podem apresentar uma resposta imune contra essa proteína após uma injeção do receptor de transferrina murino purificado, indicando que qualquer tolerância que haja contra essa proteína pode ser rapidamente quebrada após a exposição a níveis muito elevados dela. Esses camundongos vacinados vão rejeitar qualquer melanoma inoculado subsequentemente que superexpresse o receptor de transferrina de camundongos, sugerindo uma estratégia mais geral para induzir respostas imunes potentes em pacientes com câncer. As estratégias que podem ser usadas para mobilizar o sistema imune contra o desenvolvimento de tumores serão discutidas novamente, mais tarde, neste capítulo.

15.14 Células tumorais podem escapar da detecção do sistema imune pela supressão da expressão de antígenos de superfície

As descrições acerca da função do sistema imune mencionadas anteriormente poderiam sugerir que as tentativas do sistema imune a fim de ativar mecanismos de defesa contra o

crescimento da maior parte dos tumores são relativamente raras, em grande parte por causa da tolerância apresentada pelo sistema imune contra os antígenos apresentados pela maioria das células tumorais. Na realidade, quantidades (concentrações) relativamente altas de moléculas de anticorpo que ligam antígenos de superfície de células tumorais são freqüentemente encontradas no sangue de pacientes com câncer, podendo estar presentes em muitos pacientes. Tanto os linfócitos T como auxiliares que reconhecem antígenos de transplantação associados a tumores (TATAs) são prontamente detectados no sangue, linfonodos e tumores de muitos pacientes.

Essas observações indicam que, apesar do fenômeno de tolerância imunológica, o sistema imune é capaz de ativar defesas contra vários (ou talvez todos) tipos de células tumorais. Essa idéia é reforçada pelo fato de que existe uma maior incidência de tumores em pacientes imunocomprometidos (Seção 15.9).

Ainda, o desenvolvimento de muitos tumores humanos é claramente resistente aos mecanismos de defesa imunológica, que são, de certa forma, extraordinariamente eficientes. Por exemplo, imunologistas identificaram que a expressão (por moléculas de classe I) de aproximadamente 10 cópias de oligopeptídeos TATA ou TSTA sobre a superfície de células tumorais é suficiente para atrair células T citotóxicas, que expressam receptores de células T para o reconhecimento de antígenos apropriados, as quais são capazes de matar essa célula tumoral.

As falhas repetidas do sistema imune humano em utilizar esses linfócitos potentes e outras ferramentas imunológicas capazes de bloquear o desenvolvimento tumoral requerem algumas explicações. Uma delas é sugerida pelo comportamento de camundongos geneticamente alterados descritos previamente (Seção 15.8): alguns tumores humanos são muito antigênicos e são eficientemente eliminados pelo sistema imune normal; esses tumores são raramente encontrados no organismo humano. Outros tumores são pouco antigênicos, uma vez que expressam apenas proteínas para as quais o sistema imune é tolerante; esses tumores se desenvolvem e se tornam clinicamente aparentes.

Outra possibilidade é que alguns tumores antigênicos podem inicialmente sofrer algum impacto por causa do ataque, a partir de um ou outro mecanismo imunogênico, mas conseguem encontrar formas de escapar da eliminação – as estratégias da **imunoevasão** (Tabela 15.3). Essas células podem proliferar e progredir, originando tumores que podem ser fatais. Este último cenário pode descrever a história da maior parte dos tumores humanos, como sugerido pelas mudanças freqüentemente observadas nas células de tumores humanos, as quais podem apenas ser compreendidas como manobras dessas células a fim de escapar do ataque imunológico.

A manobra evasiva mais óbvia para um tumor é frear a expressão de antígenos de transplantação associados a tumores (TATA) ou específicos de tumores (TSTA) que levam à ativação

Tabela 15.3 Estratégias imunoevasivas usadas pelas células tumorais

Estratégia	Mecanismo	Agente sendo evadido
Encobrir a identidade	reprime antígenos tumorais (TATA ou TSTA), reprime proteínas MHC de classe I	linfócitos T citotóxicos
Encobrir o estresse	reprime ligantes NKG2D (p. ex., MICA)	células matadoras naturais
Inativar imunócitos	destrói receptores de imunócitos satura receptores de imunócitos com adenosina, MICA	células matadoras naturais; linfócitos T citotóxicos células matadoras naturais; vários imunócitos
Evitar a apoptose	inibe a cascata de caspases por aumentar IAPs, adquire resistência à apoptose mediada pelo FasL	
Induzir a apoptose de imunócitos	libera FasL solúvel libera citocinas (IL-10, TGF- β)	linfócitos T citotóxicos linfócitos T citotóxicos, células dendríticas, macrófagos
Neutralizar toxinas intracelulares	detoxificação enzimática de H ₂ O ₂ , prostaglandina E ₂	macrófagos, células matadoras naturais
Neutralizar complemento	superexpressa mCRPs	sistema complemento

do sistema imune e de linfócitos citotóxicos. De forma importante, a maior parte desses antígenos representa moléculas que não participam *causalmente* da transformação neoplásica, mas em vez disso, são apenas antígenos de diferenciação tecido-específicos, freqüentemente aqueles tipicamente expressos nos tecidos nos quais os tumores se originaram (veja a Figura 15.24). A expressão desses antígenos pode ser comumente reprimida por células tumorais sem nenhum dano, ou seja, sem que haja comprometimento da sobrevivência continuada ou da proliferação dessas células. De fato, as populações de células tumorais freqüentemente apresentam variantes em seu meio que tenham suprimido a expressão de genes que codificam antígenos, por meio da metilação do promotor (Seção 7.8). Essas variantes antígeno-negativas podem, assim, ser capazes de escapar ao ataque do sistema imune ativado contra a massa tumoral, sendo que suas descendentes vão emergir como a população dominante dessa massa.

Em um caso ilustrativo, um paciente com melanoma foi vacinado com uma proteína tirosinase a fim de induzir reatividade imune contra essa proteína, a qual é expressa pelas células do melanoma. (A enzima tirosinase participa da síntese de pigmentos por melanócitos e não está envolvida na transformação neoplásica; veja a Figura 15.24A.) A princípio, a resposta imune resultante produziu uma regressão da metástase tumoral. Entretanto, algumas variantes celulares negativas para a tirosinase emergiram dentre as células da metástase. Enquanto as células positivas para tirosinase continuaram a regredir, aquelas negativas começaram a proliferar rapidamente, causando a morte do paciente, por meio de um fenômeno algumas vezes chamado de “escape imune” pelos imunologistas tumorais. Todavia, em um outro caso de melanoma, esse tipo de imunoevasão não garantiu proteção das células tumorais em longo prazo contra o ataque do sistema imune (Barra lateral 15.2).

Em muitos tipos de câncer, as células tumorais não podem apenas reprimir a expressão de um antígeno tumoral, simplesmente porque a expressão continuada de antígenos TATA ou TSTA pode ser essencial para a proliferação neoplásica continuada. Por exemplo, a superexpressão da proteína HER2/Neu – o receptor de fatores de crescimento expresso por 30% dos tumores de mama (veja a Figura 4.6) – pode estimular o sistema imune. Entretanto, as células neoplásicas desses carcinomas não podem reduzir completamente a expressão desses antígenos, pois sua produção continuada em altos níveis é crítica para o processo de proliferação e por sua capacidade de contornar os mecanismos de apoptose.

Conseqüentemente, as células tumorais que não podem reduzir a expressão de TATA ou TSTA em virtude de sua contribuição essencial para o crescimento neoplásico podem utilizar estratégias alternativas a fim de evitar a proteção pelo sistema imune. Uma estratégia imunoevasiva importante e bastante utilizada envolve a habilidade de certas células tumorais em reprimir a expressão de suas moléculas MHC de classe I, que são responsáveis pela apresentação de antígenos. Isso é freqüentemente obtido pela repressão da transcrição de genes MHC de classe I (Barra lateral 15.3). Na verdade, já foram identificados muitos tipos de células tumorais humanas que não expressam níveis normais dessas moléculas MHC, prevenindo, assim, o aparecimento de antígenos oligopeptídicos na superfície delas (Figura 15.27).

A perda da expressão de proteínas MHC de classe I em geral é associada a tumores mais invasivos e metastáticos. Por exemplo, em mais da metade dos tumores de mama, a expressão dessas moléculas críticas para a apresentação de antígenos foi totalmente perdida e esse fato foi correlacionado a um mau prognóstico. Além disso, as células de carcinoma que formam micrometástases na medula óssea (Figura 14.10) apresentam níveis baixos ou ausência completa de moléculas MHC de classe I, possivelmente porque ocorre imunovigilância intensa nesses tecidos.

As células tumorais também podem usar mecanismos pós-traducionais para reduzir a apresentação de antígenos mediada por moléculas MHC de classe I. Por exemplo, a migração dessas moléculas do retículo endoplasmático para a superfície celular depende da associação com a proteína β_2 -microglobulina (β_2m). Normalmente, a β_2m conduz as moléculas

Barra lateral 15.2 A imunoevasão pode oferecer às células tumorais apenas um adiamento temporário do ataque imune Cinco anos após a ressecção de um melanoma primário, um paciente com melanoma retornou com múltiplas metástases nos linfonodos, os quais foram removidos cirurgicamente (Figura 15.26). Nessa situação, os linfócitos citotóxicos infiltrantes de tumores (CTLs) reconheceram MART-1, um dos antígenos tumorais associados a melanoma bem-estudados. O paciente ficou livre dos sintomas por mais seis anos, quando apresentou uma recidiva do melanoma em um linfonodo regional, o qual também foi removido. Nessa ocasião, a apresentação mediada pelo MHC de classe I dos oligopeptídeos MART-1 estava ausente nas células tumorais, e as CTLs presentes no tumor que poderiam reconhecê-lo estavam quase ausentes. (Entretanto, a síntese de MART-1 pelas células tumorais continuou.) Por outro lado, os CTLs associados ao tumor reconheceram um segundo antígeno associado a melanoma – tirosinase – o qual estava sendo apresentado pelas moléculas MHC de classe I.

Esse comportamento sugere que o sistema imune do hospedeiro foi capaz de se adaptar dinamicamente às manobras evasivas iniciais

das células de melanoma (eliminação da apresentação do antígeno MART-1) por redirecionar suas energias para montar um ataque sobre outro antígeno associado a tumores (tirosinase). Contudo, no período da terceira cirurgia, as células do melanoma do paciente começaram a perder quase toda a expressão de MHC de classe I. Essa perda deveria ter eventualmente permitido que as células tumorais disseminadas que persistiram depois da terceira cirurgia escapassem de todo o ataque CTL e se multiplicassem rapidamente em metástases que comprometessem a vida. Apesar disso, o paciente sobreviveu por mais cinco anos e morreu de causas não-relacionadas ao melanoma. Sua capacidade de sobreviver a um câncer que em geral é bastante agressivo sugeriu que seu sistema imune foi capaz de manter algumas células de melanoma em “observação” por meio de mecanismos ainda não definidos. É bem possível que células matadoras naturais, as quais são conhecidas por atacar células que não possuem expressão MHC de classe I (a ser discutido brevemente), foram responsáveis pelos últimos cinco anos de vida do paciente, livres de sintomas.

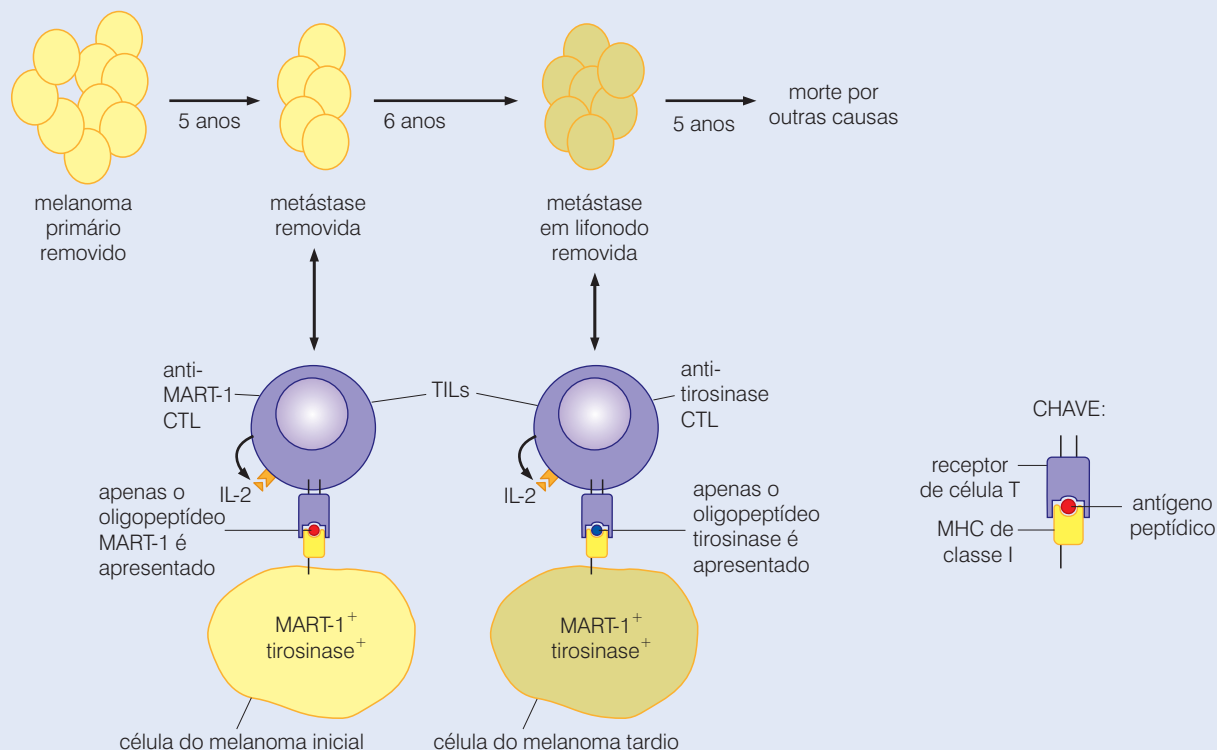


Figura 15.26 Adaptação dinâmica pelo sistema imune para iniciar a apresentação de antígenos de células tumorais Um melanoma foi removido e, cinco anos depois, quando as metástases apareceram e foram removidas, as células tumorais apresentaram apenas o antígeno oligopeptídico MART-1 na superfície dos receptores MHC de classe I (*ponto vermelho*), apesar de essas células produzirem ambas as proteínas, tirosinase e MART-1; nesse tempo, os linfócitos citotóxicos infiltrantes do tumor (CTLs) reconheceram o antígeno MART-1 por meio de seus receptores de células T. Seis anos mais

tarde, quando uma metástase em um linfonodo foi descoberta e removida do paciente, as células tumorais continuavam a produzir ambas, tirosina e MART-1, mas suas moléculas MHC de classe I expressavam apenas o antígeno oligopeptídico da tirosinase (*ponto azul*), e as CTLs infiltrantes de tumores reconheceram apenas o antígeno tirosinase. Assim, o sistema imune foi capaz de co-evoluir com as células tumorais, gerando CTLs com uma nova especificidade, como necessário para combater as células de melanoma.

MHC juntamente com sua carga de oligopeptídeos para a superfície celular (Figura 15.28A). Contudo, em certos tipos de tumores, a redução da síntese de β_2m não permite que as moléculas MHC de classe I carregadas com oligopeptídeos alcancem a superfície celular (Figura

Barra lateral 15.3 Oncoproteínas podem auxiliar células tumorais a escaparem do ataque imune Além dos seus efeitos em guiar a proliferação de células, algumas oncoproteínas podem ajudar essas células a escaparem da detecção imune. Assim, em alguns tumores, as ações do Myc e seus correlatos próximos, N-Myc e L-Myc, são responsáveis por reduzir a expressão MHC de classe I. Em neuroblastomas em crianças, essa perda é frequentemente atribuída à superexpressão do gene N-Myc (Seção 4.5). Em melanomas, a perda da expressão de HLA-B (um tipo de molécula MHC de classe I) é correlacionada com a superexpressão de *myc*. E, em carcinoma de pulmão de células pequenas (SCLCs), a superexpressão de L-myc está correlacionada com a perda de expressão de MHC de classe I pelas células tumorais.

Em muitos desses tumores, a perda de expressão de MHC de classe I parece ser decorrente de uma seqüência complexa de eventos: as proteínas N-Myc e L-Myc superexpressas bloqueiam a expressão de um outro fator de transcrição, chamado CIITA, que é responsável pela indução da expressão gênica de MHC de classe I e classe II mediada por interferon γ . Em muitos tumores que ocorrem frequentemente, como melanomas e carcinomas de cólon e próstata, a supressão de MHC de classe I é obtida por mecanismos moleculares pouco conhecidos.

15.28B). Uma outra etapa posterior da apresentação de antígenos também pode ser comprometida: em alguns tumores, defeitos das proteínas TAP1 ou TAP2 (transportadores associados à apresentação de antígenos) podem ser detectados (Figura 15.28C). Essas duas proteínas são necessárias para o transporte de oligopeptídeos gerados por proteossomas no citosol de moléculas MHC de classe I, no lúmen do retículo endoplasmático. Na ausência das duas proteínas TAP, a apresentação de antígenos pelas moléculas MHC também é falha.

Uma vez que são apenas correlacionais, essas observações sobre o comprometimento da apresentação de antígenos mediada por moléculas MHC não provam que esses efeitos são *causalmente* envolvidos na capacidade das células tumorais de escaparem do ataque imunológico. Evidências de uma relação direta entre a função deficitária do sistema MHC e os mecanismos de imunoevasão são limitadas e subjetivas. Por exemplo, em um caso bem-documentado de melanoma humano tratado com imunoterapia antitumoral, células com baixos níveis de expressão de moléculas MHC proliferaram e foram resistentes à terapia. Em outros casos, incluindo muitos neuroblastomas e carcinomas de células pequenas de pulmão (SCLCs), a perda da expressão de moléculas MHC de classe I foi correlacionada com a ausência virtual de linfócitos infiltrantes tumorais (TILs; Seção 15.9), os quais parecem constituir elementos-chave para a defesa pelo sistema imune.

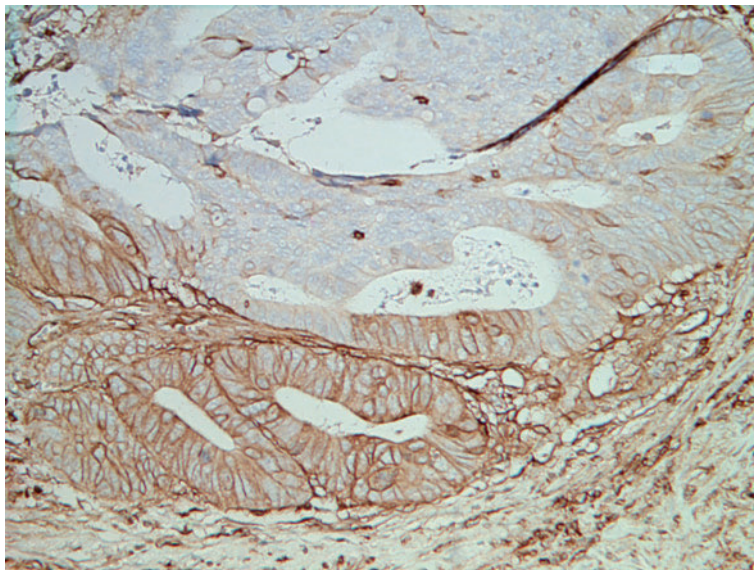


Figura 15.27 Imunoevasão por meio da supressão da expressão de MHC de classe I As células tumorais irão frequentemente diminuir a expressão de moléculas MHC de classe I, ostensivamente, a fim de evitar o reconhecimento e o ataque por componentes celulares da resposta imune adaptativa. Nesta coloração de imunohistoquímica, as células de um tumor colorretal humano são visualizadas. Elas foram imunomarcadas com um anticorpo que reconhece uma molécula MHC de classe I – HLA-A. Como visto aqui, as células da parte inferior do tumor expressam HLA-A de forma marcante, enquanto as células na parte superior do tumor apresentam uma perda parcial ou total da expressão de HLA-A. (Extraída de A.G. Menon, H. Morreau, R.A. Tollenaar et al., *Lab. Invest.* 82:1725-1733, 2002.)

De fato, a ausência total de moléculas MHC de classe I levaria à ativação de células matadoras naturais, as quais controlam continuamente os tecidos do organismo, em busca de células que tenham perdido essas proteínas-chave de sua superfície. Isso explicaria por que algumas células tumorais irão suprimir seletivamente a expressão de apenas uma dentre as seis moléculas MHC de classe I que são normalmente expressas de forma concomitante por todas as células do organismo. Essa supressão pode bloquear a apresentação de um antígeno tumoral em particular, permitindo, assim, que o tumor sobreviva livre do ataque de linfócitos citotóxicos antígeno-específicos. Entretanto, como apenas uma pequena proporção da população total de moléculas MHC de classe I é perdida, essas células podem falhar em ativar a defesa por células matadoras naturais.

Em conjunto, essas várias observações sugerem que, por atacar células tumorais expressando moléculas MHC de classe I que estão associadas a antígenos oligopeptídicos, o sistema imune cria uma pressão seletiva marcante para uma série de células tumorais que não mais expressam essas moléculas apresentadoras de antígeno em sua superfície. Uma vez que a expres-

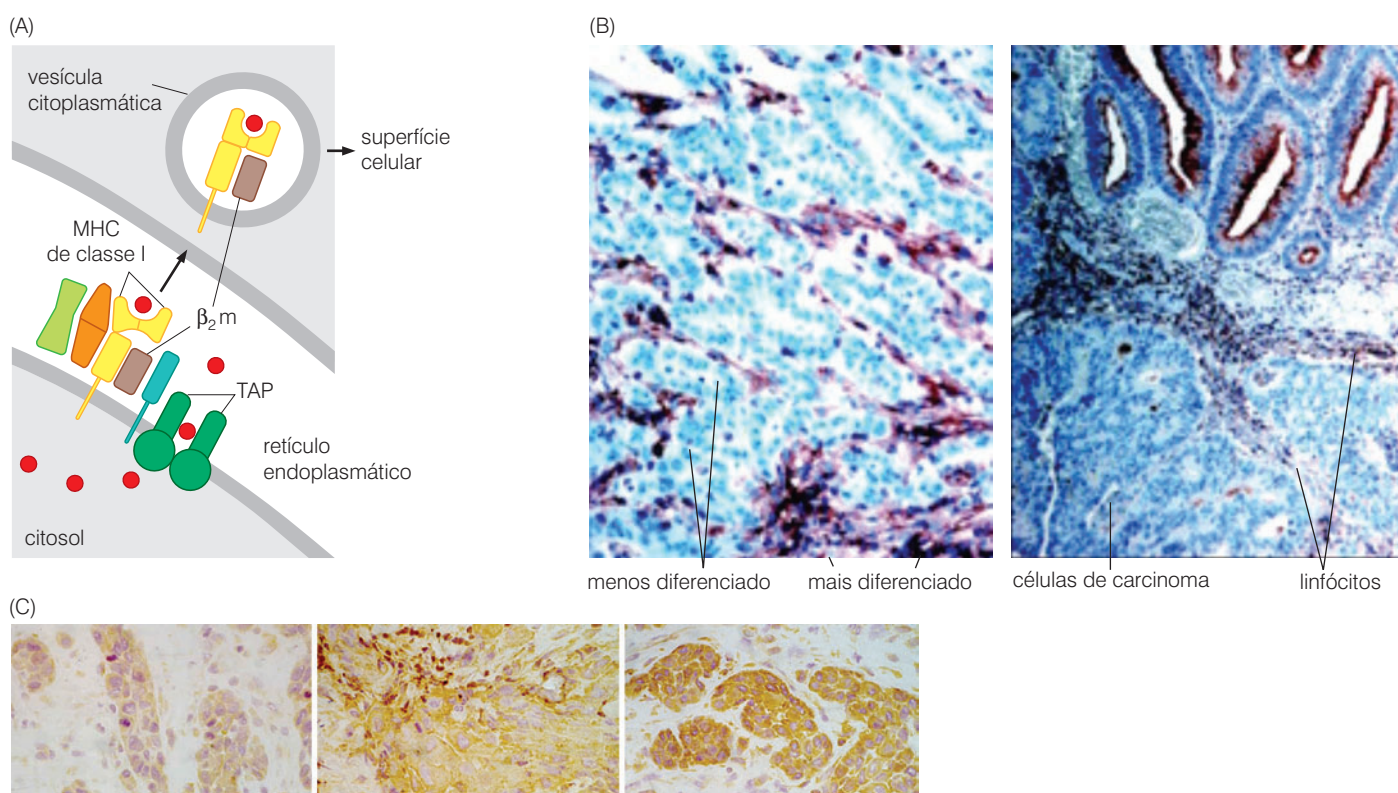


Figura 15.28 Falha na apresentação de antígenos ocasionada pela perda de β_2 -microglobulina ou TAP-1 (A) Uma análise mais detalhada da Figura 15.10A revela que o complexo TAP (um heterodímero das proteínas TAP1 e TAP2) (transportadores associados ao processamento de antígenos; verde) está envolvido no transporte de oligopeptídeos (pontos vermelhos) a partir do citosol para o lúmen do retículo endoplasmático, onde os oligopeptídeos podem associar-se a moléculas MHC de classe I (amarelo). Independentemente disso, a molécula de β_2 -microglobulina (β_2 m, marrom) se associa a moléculas MHC de classe I e auxilia a direcioná-las, em conjunto com seus antígenos oligopeptídicos capturados, para a superfície celular. As moléculas MHC de classe I requerem ambos, um antígeno oligopeptídico e uma molécula β_2 m associada, a fim de alcançar a superfície celular (veja também a Figura 15.18B). Assim, defeitos tanto da β_2 m quanto da proteína TAP previnem a expressão de antígenos oligopeptídicos na superfície da célula. (B) Em um carcinoma colorretal humano (painel à esquerda), a marcação para β_2 m (marrom-avermelhado) está presente nas células tumorais que formam as estruturas tubulares mais diferenciadas (abaixo), enquanto as células de carcinoma menos diferenciadas (azul-claro, acima)

não expressam qualquer β_2 m. Em um segundo carcinoma colorretal (painel à direita), a β_2 m está presente nos linfócitos infiltrantes (vermelho-escuro), mas é totalmente ausente em muitas células do carcinoma (azul-claro, metade inferior). Em 5 de 17 tumores colorretais com instabilidade de microssatélites (MIN) (veja a Barra lateral 15.1), o gene β_2 m foi identificado com mutações de inativação, enquanto, em vários outros tumores, foi silenciado transcricionalmente por meio de mecanismos desconhecidos. (C) O processamento deficiente de antígenos é frequentemente observado nos carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço (HNSCCs), nos quais a expressão de TAP1 e TAP2 é frequentemente perdida. A marcação de imuno-histoquímica mostrada aqui revela a expressão de TAP em um grupo de HNSCCs como sendo variável, estando ausente em alguns tumores (esquerda), presente em partes de alguns outros (meio) e, ainda, expresso normalmente em outros (direita). (A, extraída de C.A. Janeway Jr. et al., *Immunobiology*, 6th Ed., New York: Garland Science, 2005; B, extraída de M. Kloor, C. Becker, A. Benner et al., *Cancer Res.* 65:6418-6424, 2005; C, extraído de M. Meissner, T.E. Reichert, M. Kunkel et al., *Clin. Cancer Res.* 11:2552-2560, 2005.)

são dessas moléculas de superfície tende a ser perdida em células metastáticas e invasivas, é possível, como especulado anteriormente, que o sistema imune seja capaz de ativar um ataque às células tumorais em larga escala apenas depois que elas tenham invadido o estroma, no qual as células imunes estão presentes em um número substancial.

15.15 Células tumorais se protegem dos mecanismos de defesa mediados por células matadoras naturais

Como mencionado várias vezes anteriormente, a tática de evasão que envolve a supressão da expressão de moléculas MHC de classe I, por mais efetiva que seja, apresenta alguns riscos: o sistema imune pode antecipar essa estratégia e usar suas células matadoras naturais (NK) para atacar as células que não possuem moléculas MHC de classe I em sua superfície. Essa resposta NK pode também frustrar os planos de vírus tumorais que tentam enganar a detecção pelo sistema imune, por não permitir que as células infectadas expressem moléculas MHC de classe I e, conseqüentemente, antígenos oligopeptídicos virais em sua superfície.

Um receptor normalmente expresso na superfície de células matadoras naturais reconhece moléculas MHC de classe I expressas por células-alvo potenciais (Figura 15.29). A ligação de moléculas MHC de classe I dessas células-alvo aos seus receptores nas células matadoras naturais (chamado de receptor inibitório *killer* ou KIR) faz com que esse receptor libere sinais no citoplasma das células matadoras naturais, indicando que qualquer tentativa de dar continuidade ao processo de eliminação de células positivas para MHC de classe I é inapropriada e deve ser limitada imediatamente. Por outro lado, esses sinais supressores são perdidos quando uma célula matadora natural encontra uma célula potencial que não possua moléculas MHC de classe I em sua superfície, sendo que, nesse caso, é dada continuidade ao processo de morte celular. (Essa eliminação de células negativas para MHC de classe I por meio de células matadoras naturais pode explicar por que, em certas classes de tumores em humanos, a ausência da expressão de moléculas classe I está diretamente relacionada com um bom prognóstico clínico – um comportamento oposto ao discutido anteriormente.)

Uma outra forma de interação inata de células matadoras naturais com células tumorais parece ser igualmente importante. Essa interação em particular depende do fato de que muitos tipos de células humanas são programados para expressar proteínas específicas sobre sua superfície toda vez que forem expostas a estímulos estressores fisiológicos, incluindo o estresse resultante de infecções virais e a transformação neoplásica. Essas proteínas estressoras são

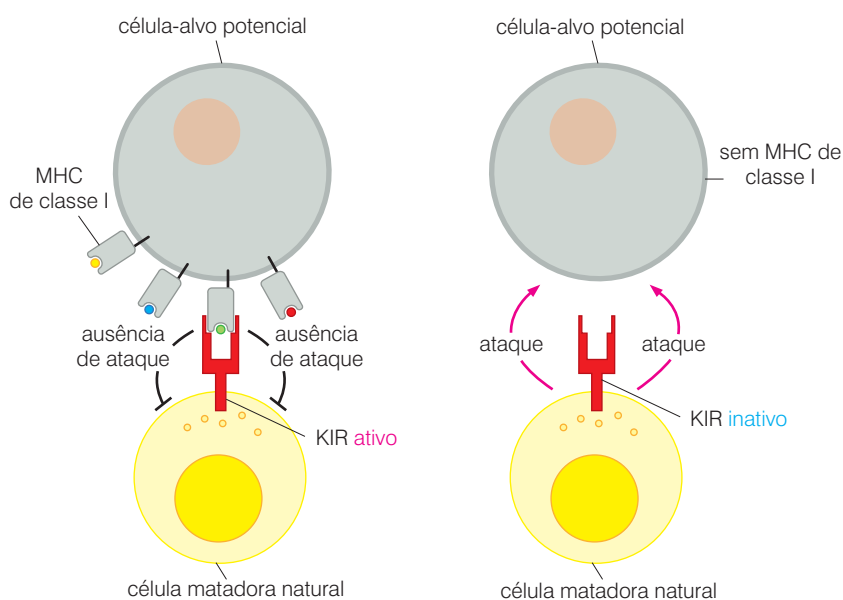


Figura 15.29 Controle da morte mediada por células matadoras naturais pelo receptor KIR. As células matadoras naturais (amarelo, inferior) expressam um receptor inibitório de morte (KIR, vermelho) que reconhece moléculas MHC de classe I que são expressas na superfície de células-alvo potenciais (cinza, acima). No momento em que esse reconhecimento acontece, o KIR libera sinais inibitórios que previnem o ataque por células matadoras naturais (esquerda). Por outro lado, na ausência desse reconhecimento e do silenciamento funcional do KIR, o ataque pelas células matadoras naturais é permitido (direita). (Note que o KIR reconhece e se liga a uma característica estrutural constante das moléculas MHC de classe I, mas não reconhece um antígeno oligopeptídico alojado no sítio de ligação ao antígeno da molécula MHC de classe I.)

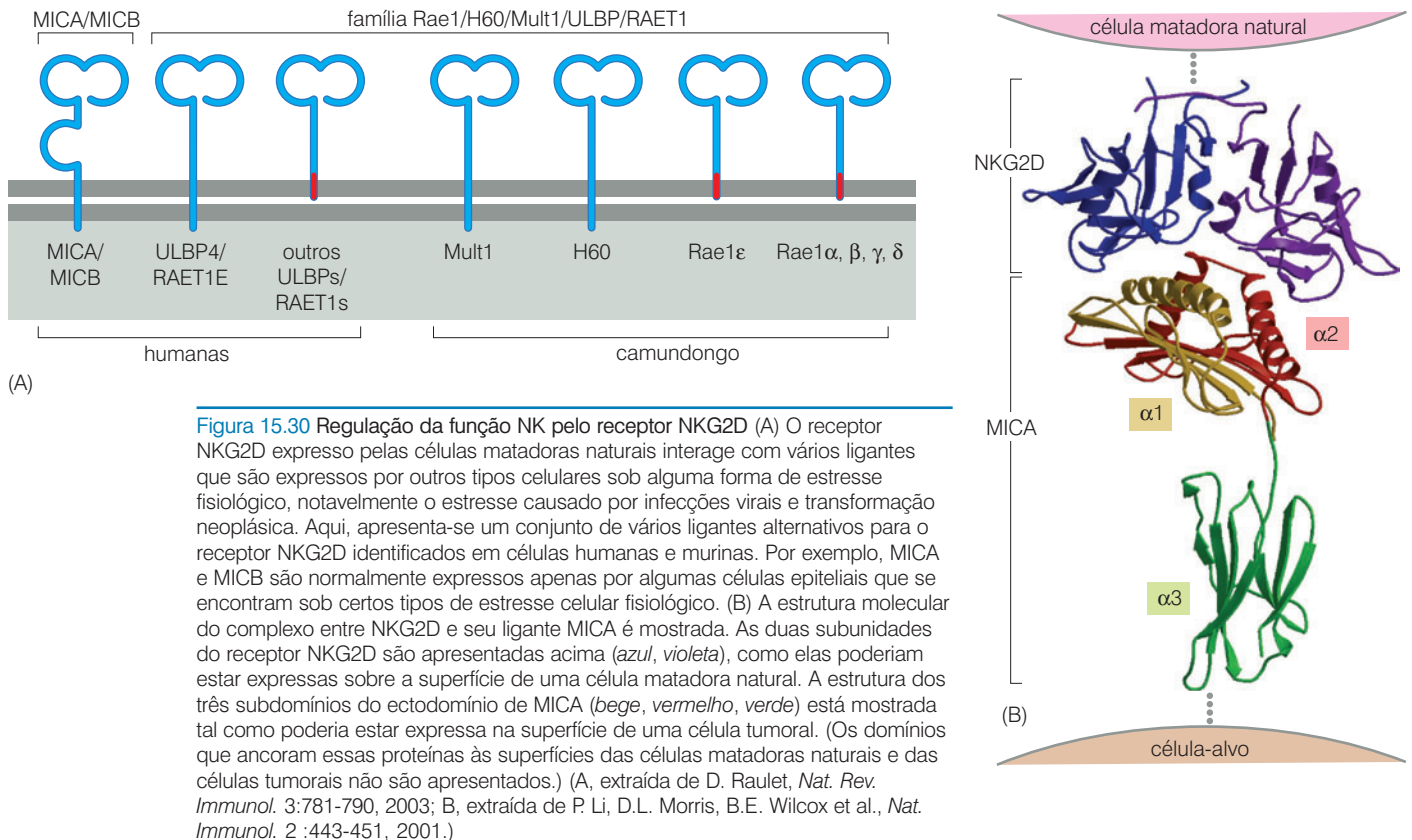


Figura 15.30 Regulação da função NK pelo receptor NKG2D (A) O receptor NKG2D expresso pelas células matadoras naturais interage com vários ligantes que são expressos por outros tipos celulares sob alguma forma de estresse fisiológico, notavelmente o estresse causado por infecções virais e transformação neoplásica. Aqui, apresenta-se um conjunto de vários ligantes alternativos para o receptor NKG2D identificados em células humanas e murinas. Por exemplo, MICA e MICB são normalmente expressos apenas por algumas células epiteliais que se encontram sob certos tipos de estresse celular fisiológico. (B) A estrutura molecular do complexo entre NKG2D e seu ligante MICA é mostrada. As duas subunidades do receptor NKG2D são apresentadas acima (azul, violeta), como elas poderiam estar expressas sobre a superfície de uma célula matadora natural. A estrutura dos três subdomínios do ectodomínio de MICA (bege, vermelho, verde) está mostrada tal como poderia estar expressa na superfície de uma célula tumoral. (Os domínios que ancoram essas proteínas às superfícies das células matadoras naturais e das células tumorais não são apresentados.) (A, extraída de D. Raulet, *Nat. Rev. Immunol.* 3:781-790, 2003; B, extraída de P. Li, D.L. Morris, B.E. Wilcox et al., *Nat. Immunol.* 2 :443-451, 2001.)

chamadas de MICA, MICB, ULBP4 e de vários outros nomes (Figura 15.30A). Por sua vez, as células matadoras naturais apresentam um receptor complementar na superfície celular, denominado NKG2, que é especializado no reconhecimento de proteínas celulares associadas ao estresse sobre a superfície de células-alvo potenciais (Figura 15.30B). A ligação dessas proteínas ao receptor NKG2D resulta em uma ativação marcante de uma resposta citotóxica por parte das células matadoras naturais e é, assim, rapidamente seguida pela eliminação das células que expressam proteínas de estresse em suas superfícies.

Como uma demonstração dessa dinâmica, um gene codificando o antígeno MICA de camundongos, homólogo ao humano, foi introduzido em células de linfoma de camundongo, induzindo a expressão de níveis significativos desse antígeno em sua superfície. Tais células perderam, assim, o potencial tumoral quando injetadas em camundongos. Entretanto, se esses camundongos fossem previamente depletados de suas células matadoras naturais, as células de linfoma expressando a MICA homóloga se tornariam novamente tumorogênicas.

Em resumo, as células matadoras naturais reconhecem instintivamente as células tumorais de duas formas: elas percebem tanto a ausência de proteínas MHC de classe I como a presença de uma ou mais proteínas associadas a estresse (p. ex., MICA) sobre a superfície de células tumorais. Quando as duas condições são satisfatórias, a eliminação de células tumorais é mais eficiente do que em relação às células que apresentam apenas uma ou outra dessas condições. Na realidade, alguns imunologistas acreditam que as duas condições devem ser preenchidas (i. e., baixos níveis de MHC de classe I e altos níveis de ligantes NKG2D associados ao estresse, como MICA) antes que o processo de eliminação pelas células matadoras naturais seja iniciado.

Em uma situação em que a expressão de ligantes para NKG2D limita células tumorais, sua resposta imunoevasiva é direta: elas suprimem a expressão desses ligantes, como MICA, de sua superfície, privando assim as células matadoras naturais de uma forma importante de reconhecimento. Ainda é necessário esclarecer precisamente como essa supressão é alcançada, embora a metilação de promotores tenha sido demonstrada em um pequeno número de casos.

De fato, muitos tipos de células de carcinoma humano e de células de melanoma desabilitam essa via de sinalização NKG2D como uma estratégia imunoevasiva alternativa: elas continuam a sintetizar quantidades significativas de MICA, mas lançam boa parte dessa proteína no meio que as circunda (em vez de expressá-la na superfície celular). A MICA liberada na forma solúvel pode ser detectada no soro de muitos pacientes com câncer e age como um ligante “isca” que se associa aos receptores NKG2D das células matadoras naturais. Assim, a MICA solúvel se liga aos receptores NKG2D das células matadoras naturais (e das células T citotóxicas), causando endocitose e degradação desses receptores, tornando esses imunócitos incapazes de responder às moléculas de MICA que continuam a ser expressas na superfície das células dos pacientes com câncer.

Para concluir a discussão sobre as células tumorais e suas interações com as células matadoras naturais, é necessário observar a forma peculiar pela qual células tumorais podem produzir metástase por evitar o ataque de células matadoras naturais. As células tumorais que entraram em contato direto com a circulação rapidamente adquirem a capacidade de se aderir a plaquetas, que, por sua vez, em conjunto com as células tumorais, formam microtrombos. Quando os mecanismos da coagulação que produzem os microtrombos são bloqueados, por meio de uma ou outra estratégia experimental, a taxa de sucesso das células metastáticas em originar novas colônias tumorais cai em uma grande percentagem em relação ao que se observaria normalmente. Isso acontece em virtude do ataque pelas células matadoras naturais, as quais normalmente são impedidas de reconhecer e destruir células-alvo neoplásicas ligadas a plaquetas. Essa manobra imunoevasiva particular não é desenvolvida pela seleção de variantes raras de células do tumor, mas, em vez disso, acontece quase ao acaso, sendo ativada rotineiramente por todas as células tumorais que tenham caído na circulação e iniciam os processos para alcançar sítios teciduais distantes no organismo.

15.16 Células tumorais ativam um contra-ataque sobre os imunócitos

Anteriormente, foi discutido que células tumorais proliferam em indivíduos imunodeprimidos, como recipientes de transplantes, cujo sistema imune está comprometido pelo uso de drogas imunossupressoras, bem como em pacientes com AIDS. Na verdade, a grande maioria dos tumores humanos pode se desenvolver em ambientes imunodeficientes. Mais precisamente, os tumores podem criar microambientes localizados em que o sistema imune está comprometido. Por manter parte das células citotóxicas a certa distância, os tumores podem assegurar certas áreas de segurança para seu crescimento em vários locais do corpo.

Uma estratégia para alcançar esse objetivo é sugerida por um dos mecanismos descritos anteriormente, que em geral é usado por linfócitos citotóxicos para eliminar seus alvos: esses linfócitos carregam moléculas do ligante Fas (FasL) em sua superfície, as quais ligam e ativam os receptores de morte Fas, expressos por outros tipos celulares do organismo. A ligação do ligante Fas ao receptor de morte leva à ativação da via apoptótica extrínseca (Seção 9.14).

Muitas células tumorais, entretanto, convertem o seu sistema de sinalização em um processo com duas etapas. Primeiro, elas desenvolvem resistência à morte mediada pelo ligante Fas, eliminando células por meio de mecanismos não-compreendidos. Por exemplo, por adquirir resistência a múltiplas formas de apoptose (veja a Tabela 9.5), as células tumorais podem se proteger da ativação da cascata apoptótica extrínseca que é desencadeada pelo receptor Fas ativado pelo ligante FasL. Claramente, essa resistência, por si só, fornece a tais células um meio de evitar a destruição por células citotóxicas, como as células T citotóxicas.

Em uma segunda etapa, muitos tipos de células tumorais passam a ter o sistema FasL-Fas sob seu controle, por adquirirem a capacidade de produzir e liberar formas solúveis do ligante FasL (Figura 15.31A e B). Entretanto, numerosos estudos indicam que esse ligante pode ativar os receptores de morte Fas expressos na superfície de vários tipos de linfócitos, levando

à sua morte. Por ativar esses mecanismos de contra-ataque sobre as células imunes adjacentes, as células tumorais podem mantê-las a certa distância, reduzindo mais uma vez o risco de serem eliminadas por elas.

Em muitos pacientes com câncer, há evidências de níveis reduzidos de linfócitos circulantes, indicando um defeito sistêmico na função imune. Em pacientes com câncer da cavidade oral, por exemplo, vesículas membranosas expressando FasL biologicamente ativo ligado à membrana podem ser encontradas na circulação (Figura 15.31C); essas vesículas parecem ser liberadas pelas células tumorais como uma forma de deprimir a função linfocitária no corpo. A importância desse mecanismo imunossupressor em particular, capaz de limitar o crescimento desse e de outros tipos de tumores, ainda precisa de maiores evidências.

Formas alternativas de contra-ataque são usadas por muitos tipos de células tumorais humanas e envolvem a liberação de interleucina-10 (IL-10) ou TGF- β . Ambas as proteínas secretadas são potencialmente imunossupressoras e agem mediante sua capacidade de induzir os linfócitos T a entrarem em apoptose. Além disso, o TGF- β pode induzir apoptose de células dendríticas e macrófagos – duas células apresentadoras de antígeno essenciais do sistema imune.

De forma interessante, a liberação de IL-10 por células tumorais humanas é mimetizada pelo vírus Epstein-Barr (EBV), o qual adquiriu e remodelou um gene celular para a IL-10. Como visto anteriormente (Seção 3.4), esse vírus é um importante agente etiológico dos linfomas de Burkitt, de outros linfomas que envolvem células da linhagem B e de carcinomas nasofaríngeos. Por induzir as células infectadas a liberarem citocinas do tipo IL-10, o vírus Epstein-Barr as protege do ataque direto por células imunes, assegurando assim proteção por longos períodos.

Uma série de experimentos é particularmente ilustrativa da capacidade imunossupressora do TGF- β e demonstra que realmente a melhor defesa é iniciar uma resposta de ataque antecipada (Figura 15.32A). Nesses experimentos, um grupo de 10 camundongos foi injetado com uma linhagem de células de melanoma de camundongo produtoras de altos níveis de TGF- β . Todos esses camundongos morreram por causa do tumor antes de 45 dias. Em um experimento complementar, os linfócitos dos camundongos foram transformados em resistentes ao ataque mediado por TGF- β , por meio do implante de medula óssea contendo células-tronco hematopoiéticas geneticamente modificadas, que expressam um receptor TGF- β do tipo II dominante-negativo (dn) (o qual bloqueia a função do receptor). Quando as células desse mesmo melanoma foram injetadas nesse segundo grupo de camundongos, 7 entre 10 ainda estavam vivos 45 dias mais tarde, e a avaliação dos seus pulmões revelou uma redução drástica das metástases (veja a Figura 15.32B). Um perfil similar foi observado quando células de carcinoma de próstata foram transplantadas em camundongos normais ou em camundongos cujas células medulares foram modificadas.

Tais observações indicam que a liberação de TGF- β pelas células do melanoma e do câncer de próstata permite que as células tumorais se defendam contra o ataque por células do sistema imune. Entretanto, uma vez que as células se tornam resistentes à apoptose induzida por TGF- β , esses imunócitos são totalmente capazes de eliminar essas células tumorais. Além disso, em camundongos transplantados com células tumorais, cujas células hematopoiéticas expressam o dominante negativo TGF- β R_{II}, os linfócitos citotóxicos que apresentam a capacidade de matar as células de melanoma *in vitro* puderam ser recuperados do baço; esses linfócitos esplênicos estavam virtualmente ausentes em animais controle, nos quais os linfócitos não possuíam esse receptor mutante.

(Tais experimentos poderiam sugerir estratégias para uma nova terapia antitumoral, na qual células da medula óssea de pacientes com câncer poderiam ser transformadas, tornando-se resistentes à apoptose induzida por TGF- β , fazendo com que essas células fossem efetivas em atacar muitos tumores humanos que liberam TGF- β . Infelizmente, uma vez que as células imunes se tornam não-responsivas ao TGF- β , elas freqüentemente iniciam uma resposta

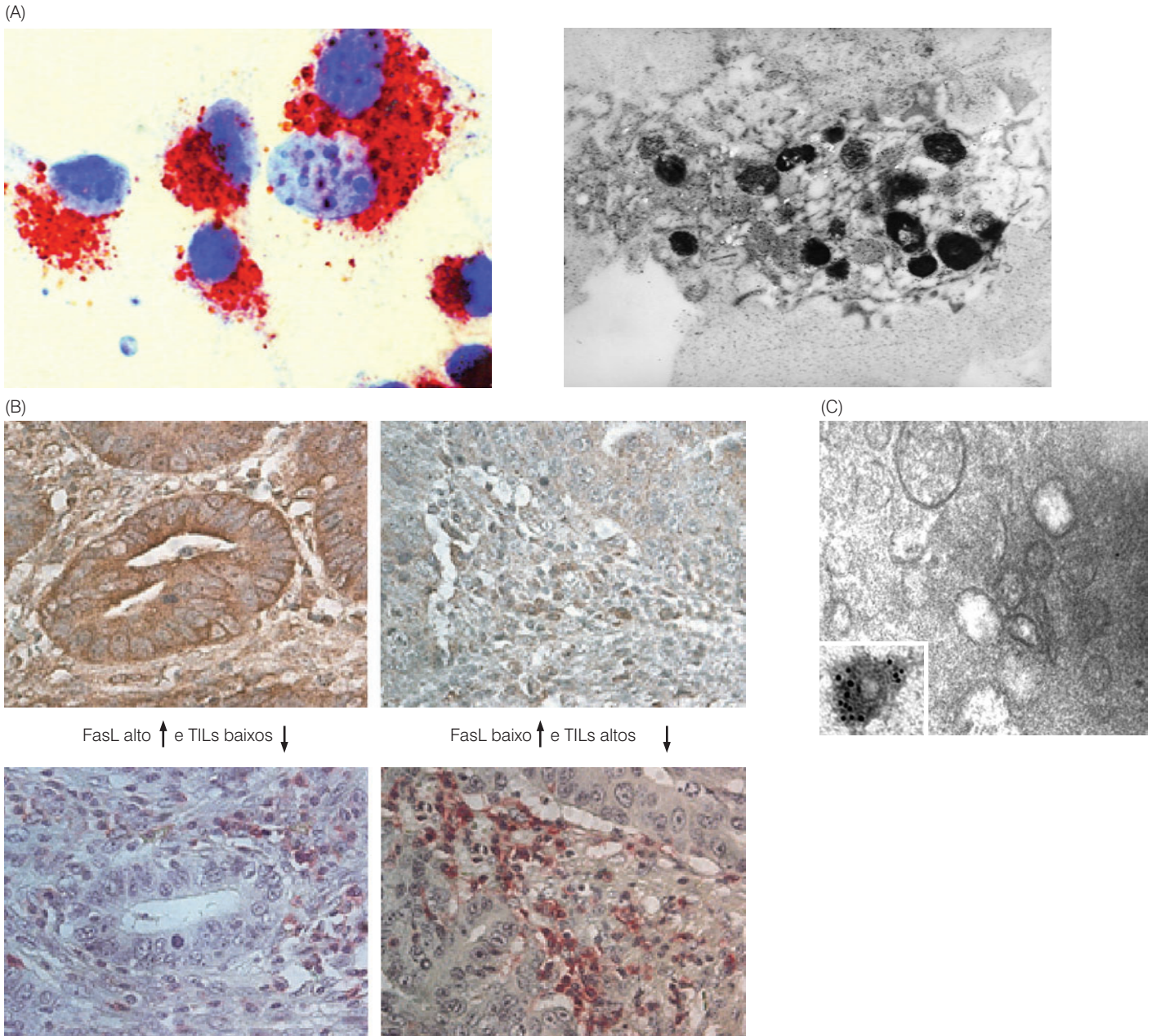


Figura 15.31 Contribuição do FasL na imunoevasão Algumas células tumorais são capazes de se proteger da eliminação por células T por meio de um processo com duas etapas. Primeiro, elas adquirem resistência à eliminação pelo FasL, o ligante do receptor de morte Fas. Segundo, elas se tornam capazes de produzir e liberar FasL, que permite matar linfócitos e outras células que se coloquem muito próximas delas. (A) Quando células de melanoma são marcadas com um anticorpo FasL, quantidades significativas de FasL podem ser vistas concentradas em vesículas (vermelho) no citoplasma; os núcleos estão em azul. Uma resolução ainda maior é obtida pelo uso de microscopia imunoelétrica (painel à direita), que revela que o FasL nas células do melanoma (pontos pretos maiores) está de fato localizado nos melanossomos (corpos citoplasmáticos que contêm as moléculas de pigmento de melanina preta de melanócitos normais); as células de melanoma podem liberar esses melanossomos no espaço extracelular, onde o FasL adquire a capacidade de induzir a morte de células que expressam o Fas, como os linfócitos adjacentes. (B) Em um adenocarcinoma de cólon, aquelas áreas do tumor nas quais altos níveis de FasL (marrom) foram evidentes (acima, à esquerda) apresentaram níveis muito baixos (no próximo corte de tecido) de linfócitos infiltrantes de

tumores (TILs; vermelho, à esquerda, abaixo). Por outro lado, aquelas áreas que apresentaram baixos níveis de FasL (marrom, acima, à direita) mostraram altos níveis de TILs (vermelho, abaixo, à direita). TILs que estavam próximos de áreas com muito FasL apresentaram altas taxas de apoptose (não-mostrado). (C) Uma explicação para a supressão frequentemente observada dos linfócitos T circulantes em pacientes com carcinoma oral poderia vir da descoberta de que a grande maioria desses pacientes (mas não controles normais) tem microvesículas em sua microcirculação que expressam FasL ligado à membrana, o qual é uma forma particularmente potente de indução de apoptose desse ligante de morte. Essas microvesículas foram purificadas a partir do soro desses pacientes, sendo demonstrado, por microscopia imunoelétrica (ver painel A), que elas contêm FasL ligado à membrana (pontos pretos, detalhe). (A, esquerda, extraída de G. Andreole, L. Rivoltini, C. Castelli et al., *J. Exp. Med.* 195: 1303-1316, 2002; A, direita, extraída de L. Rivoltini, M. Carraba, V. Huber et al., *Immunol. Rev.* 188:97-113, 2002; B, extraída de A. Houston, M.W. Bennett, G.C. O'Sullivan et al., *Brit. J. Cancer* 89: 1345-1351, 2003; C, extraída de J.W. Kim, E. Wiecekowsky, D.D. Taylor et al., *Clin. Cancer Res.* 11:1010-1020, 2005.)

auto-imune devastadora sobre os tecidos do organismo, produzindo uma condição que pode ser mais debilitante e rapidamente letal do que a doença neoplásica.)

Resultados complementares são provenientes de experimentos nos quais a capacidade das células tumorais em liberar TGF- β tenha sido muito reduzida pela inserção de construções de sentido complementar nelas. Essas células tumorais perdem muito da sua força tumorigênica, em grande parte porque são circundadas por nichos de linfócitos capazes de eliminá-las.

Em conjunto, esses vários experimentos indicam que, mesmo quando as células T citotóxicas adquirem imunorreatividade adaptativa contra células tumorais, essas células T e as NK coadjuvantes com frequência são impedidas de eliminar as células tumorais por uma variedade de

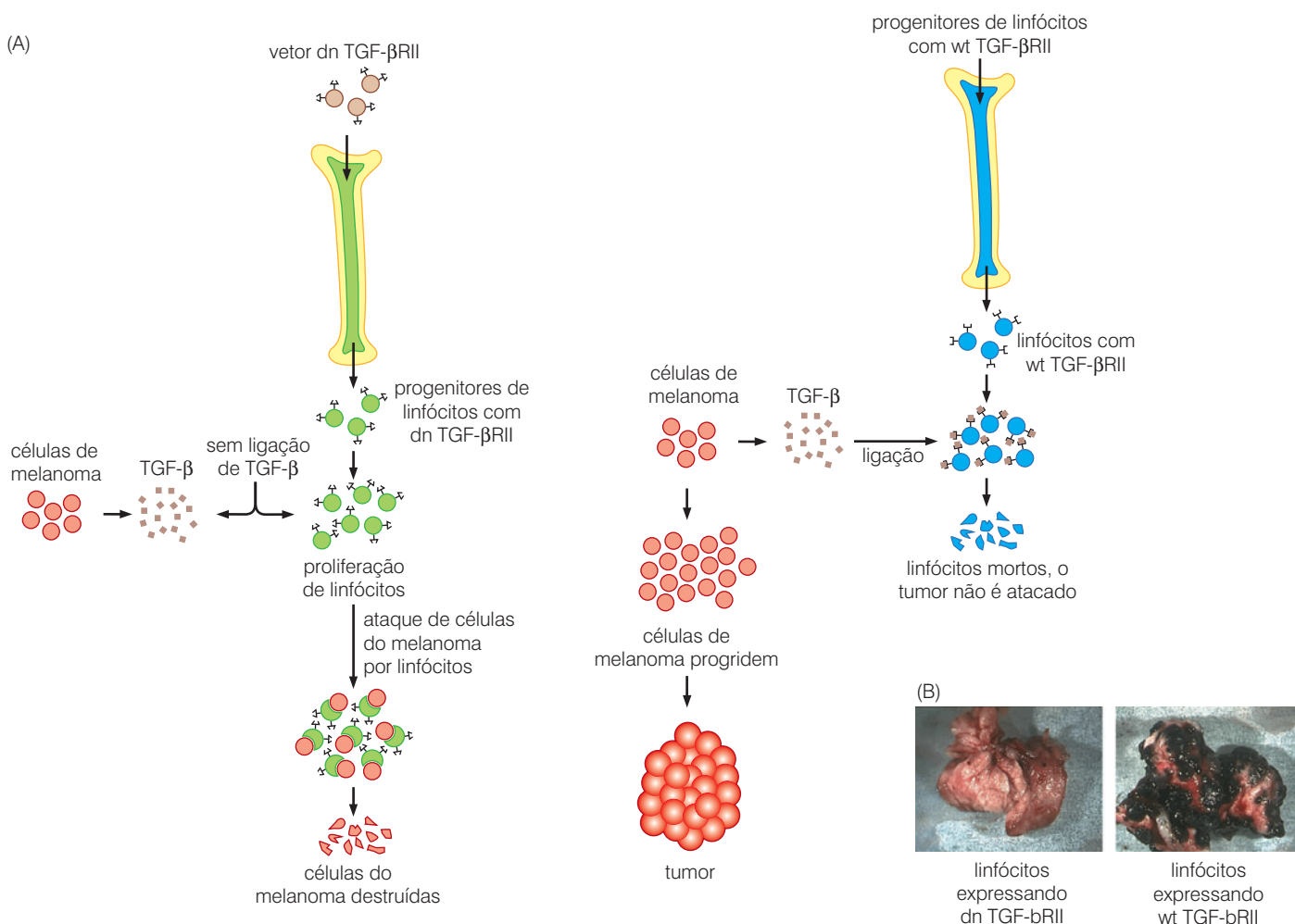


Figura 15.32 Papel do TGF- β no controle das respostas imunes (A) Se células progenitoras de linfócitos que possuem um receptor TGF- β II (dn TGF- β RII, *acima*) são introduzidas na medula de um camundongo, são formados linfócitos diferenciados (*verde*) que não têm responsividade aos efeitos de eliminação do TGF- β (*diagrama esquerdo*). Se células de melanoma são introduzidas em um camundongo que possui esses linfócitos, mesmo que essas células de melanoma sintetizem grandes quantidades de TGF- β (o qual é normalmente tóxico para os linfócitos; *quadrados bege*), os linfócitos proliferam e são capazes de matar as células do melanoma, bloqueando assim a formação do tumor. Ao contrário, quando as mesmas células de melanoma são introduzidas em um camundongo hospedeiro que tenha sido transplantado com progenitores de linfócitos expressando o receptor TGF- β II selvagem (*ilustração à direita*), o TGF- β liberado pelas células do melanoma induz os linfócitos (azul), os quais

apresentam receptores TGF- β completamente funcionais, a entrarem em apoptose (*abaixo*). Isso prova que a secreção de TGF- β é uma forma altamente efetiva pela qual as células de melanoma podem se defender contra o ataque imune. (B) As diferenças dramáticas na capacidade de formação do tumor são reveladas pelas propriedades relacionadas de células pigmentadas de melanoma em formarem metástases de pulmão. Camundongos C57/BL6 selvagens desenvolvem rapidamente muitas dessas metástases (*pontos pretos, direita*), enquanto aqueles que expressam o receptor TGF- β tipo II dominante-negativo (dn TGF- β RII) em suas células T bloquearam a formação de metástase (*esquerda*). Os pulmões foram observados aqui 21 dias depois que as células-B16 de melanoma foram injetadas por via endovenosa. (Extraída dos resultados de L. Gorelik e R.A. Flavell, *Nat. Med.* 7:1118-1122, 2001; B, extraída de A. Shah, W.B. Tabayoyong, S.D. Kundu et al., *Cancer Res.* 62: 7135-7138, 2002.)

mecanismos que envolvem este último grupo celular. Pelo menos três agentes – TGF- β , IL-10 e FasL – têm sido propostos como ferramentas utilizadas pelas células tumorais para o contra-ataque sobre os imunócitos que tentam fazer a defesa. Uma vez que a eliminação de células tumorais marcadas com anticorpos é freqüentemente conduzida por imunócitos (p. ex., células matadoras naturais, macrófagos; veja a Figura 15.3), a secreção desses agentes imunossupressores pode também proteger as células tumorais da eliminação naqueles pacientes que apresentam altos níveis de anticorpos antitumorais circulantes.

15.17 Células tumorais se tornam intrinsecamente resistentes a várias formas de eliminação usadas pelo sistema imune

As células tumorais podem também alterar a sua própria bioquímica, tornando-se menos responsivas às formas de ataque ativadas pelo sistema imune. Um exemplo dessa estratégia geral foi mencionado anteriormente: algumas células tumorais se tornam resistentes ao FasL liberado por vários tipos de imunócitos citotóxicos. Por alterarem as vias de sinalização associadas ao receptor de morte Fas, essas células se tornam relativamente insensíveis ao FasL liberado por muitos imunócitos.

Uma manobra de defesa afim é acionada em resposta a outro mecanismo usado por linfócitos T citotóxicos e células matadoras naturais para eliminação de células, incluindo as de origem tumoral. É importante lembrar que esses imunócitos introduzem uma protease – uma granzima – nas células-alvo (Seções 9.14 e 15.3), as quais são capazes de induzir a apoptose dessas células por clivar e ativar proenzimas de caspases. As células tumorais podem escapar desse mecanismo de destruição apenas por aumentarem os níveis de certas proteínas inibidoras de caspases (IAPs), as quais agem por meio do sequestro e conseqüente inativação de caspases pró-apoptóticas (Seção 9.13).

Essas duas estratégias para evitar a morte são complementações de mecanismos que já foram discutidos previamente no Capítulo 9, no qual a aquisição de resistência à apoptose foi descrita como um dos marcadores do câncer. A citotoxicidade iniciada pelo sistema imune pode ser somada a outros estressores fisiológicos, incluindo hipoxia, desequilíbrios da sinalização intracelular e perda de ancoragem, que forçam as células tumorais a desativar suas vias de sinalização pró-apoptóticas durante o curso da progressão tumoral.

Pacientes com câncer apresentam freqüentemente níveis significativos de anticorpos antitumorais em sua circulação, indicando que suas células tumorais podem carregar sítios de ligação para moléculas de anticorpo. Como pode ser observado na Figura 15.9, essas células são passíveis de eliminação pelo conjunto de proteínas plasmáticas que formam o sistema complemento. Quando participam do processo de citotoxicidade dependente do complemento (CDC), as moléculas desse sistema se associam a moléculas de anticorpo ligadas à superfície celular, formando poros na membrana plasmática adjacente, induzindo a morte celular rapidamente. As células normais se protegem da morte pelo sistema complemento por expressarem em sua membrana plasmática uma ou várias proteínas do complemento, chamadas de proteínas regulatórias do complemento ligadas à membrana (mCRPs). As proteínas mais importantes desse grupo são CD46, CD55 e CD59.

A superexpressão dessas mCRPs tem sido identificada na superfície de uma série de tipos de células tumorais. Ela confere às células tumorais uma medida de proteção da citotoxicidade dependente do complemento (Figura 15.33). As observações repetidas da expressão elevada de mCRP em uma grande variedade de células tumorais sugere que as progenitoras das células tumorais foram expostas, em alguma fase do seu desenvolvimento, por mecanismos de citotoxicidade dependentes do complemento, sendo que, em resposta, houve a seleção de algumas variantes de células tumorais resistentes ao ataque do complemento, capazes de superexpressar uma ou outra proteína mCRP. (De maneira interessante, o herpesvírus saimiri, uma forma virulenta de herpesvírus que causa linfomas e leucemias em macacos do novo mundo, expressa uma proteína relacionada à mCRP CD59 humana. Aparentemente, o vírus usa essa proteína para proteger as células infectadas dos mecanismos de destruição ativadas

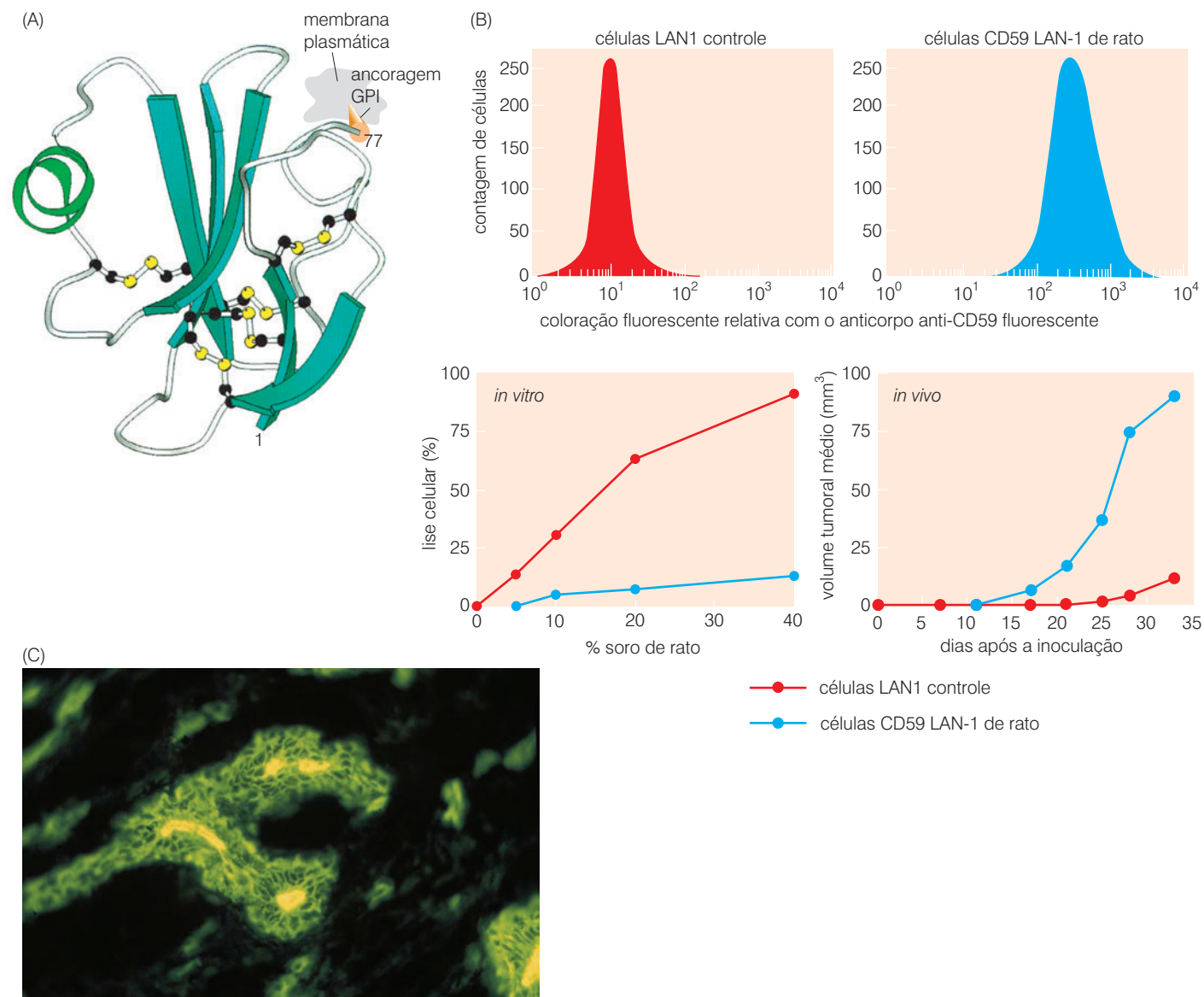


Figura 15.33 Regulação da cascata do complemento pelos mCRPs Os mCRPs (CD46, CD55 e CD59) são inibidores da cascata do complemento ligados à membrana que protegem as células da lise mediada pelo complemento e são frequentemente superexpressos pelas células tumorais humanas. (A) CD59 é uma glicoproteína ligada à membrana plasmática das células (molécula localizada posteriormente no plano da página) por uma cauda de ancoragem (marrom) de fosfatidil inositol (GPI). A estrutura do CD59 apresentada aqui foi determinada por ressonância magnética nuclear (NMR). O CD59 liga certos tipos de componentes do complemento e assim previne a formação completa do complexo de ataque da cascata (MAC), que medeia a atividade citolítica do complemento. O CD59 é estruturalmente relacionado ao receptor uPAR (veja a Figura 14.34) e a várias neurotoxinas de veneno de cobra. Resíduos de carbono e enxofre das cisteínas (preto, amarelo), hélices α (verde), folhas β pregueadas (azul-piscina) estão em destaque. (B) Células de neuroblastoma LAN1, as quais são normalmente muito sensíveis à lise pelo complemento do rato, foram transfectadas com um vetor de expressão que as induziu a superexpressar a proteína mCRP CD59 de rato. Como visto pela análise de seleção de células ativada por fluorescência (FACS) (acima, à esquerda e à direita), isso fez com que as células LAN1 normais (esquerda) expressassem níveis 20 a 30 vezes mais elevados de CD59 (direita). Quando essas duas populações de

células foram incubadas *in vitro* em meio contendo soro de rato mais um anticorpo que ativa o complemento presente nesse soro (abaixo, à esquerda), as células superexpressando CD59 foram protegidas da lise mediada pelo complemento (curva azul), em contraste às células não-manipuladas, as quais foram altamente sensíveis a essa lise (curva vermelha). Quando essas duas populações celulares foram implantadas em ratos Nude imunocomprometidos (abaixo, à direita), as células LAN1 formaram tumores apenas lentamente (curva vermelha), enquanto aquelas que superexpressaram CD59 formaram tumores rapidamente (curva azul). Isso indicou que a morte mediada pelo complemento geralmente impede o crescimento de tumores LAN1 nesses ratos. (C) Esta micrografia de imunofluorescência da secção de um carcinoma humano de ducto de mama mostra a expressão de CD59 nas células de carcinoma formadoras do ducto (verde), com virtualmente nenhuma coloração do tecido do estroma adjacente. (Uma vez que o CD59 é fracamente ligado por meio de uma ancoragem GPI às superfícies luminais das células epiteliais do ducto, ele é liberado em grandes quantidades no lúmen dos ductos, gerando uma coloração amarela intensa.) (A, extraída de C.M. Fletcher, R.A. Harrison, P.J. Lachmann and D. Neuhaus, *Structure* 2: 185-199, 1994; B, extraída de S. Chen, T. Caragine, N.-K. V. Cheung e S. Tomlinson, *Cancer Res.* 60:3013-3018, 2000; C, extraída de J. Hakulinen e S. Meri, *Lab. Invest.* 71:820-827, 1994.)

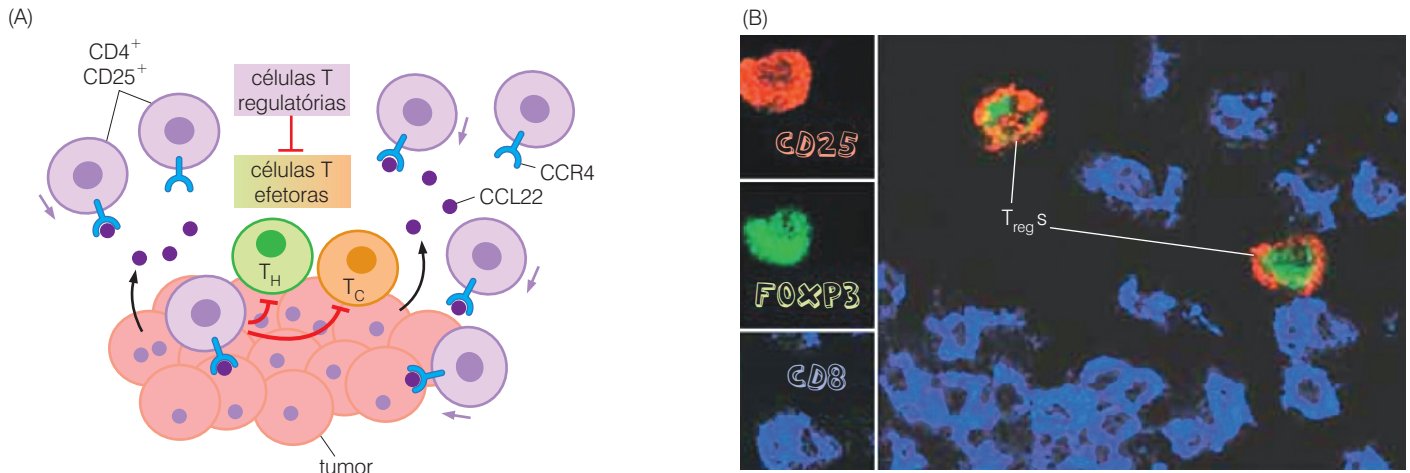


Figura 15.34 Células T regulatórias e imunoevasão tumoral (A) Células tumorais (cor-de-rosa) liberam a quimiocina CCL22 (círculos violeta pequenos), que se liga ao receptor de quimiocina CCR4 (azul) expresso pelas $T_{reg}S$, atraindo-as, dessa forma, para o tumor. Uma vez recrutadas, as $T_{reg}S$, que apresentam antígenos de superfície celular CD4 e CD25, são capazes de inibir dois tipos de "células T efectoras" – os linfócitos T auxiliares (T_H) $CD4^+CD25^-$ (verde-claro) e os linfócitos citotóxicos (T_C) $CD8^+CD25^-$ (laranja-claro). Essas ações podem incapacitar os componentes mais importantes da resposta imune do hospedeiro a um tumor. (B) A marcação por imunofluorescência revela a presença de $T_{reg}S$ por meio de sua expressão do antígeno de superfície CD25 (vermelho) e do fator de transcrição FOXP3 (verde). Elas são vistas aqui entre células T citotóxicas CD8 positivas (azul), cujas ações elas estão inibindo; esses linfócitos estavam presentes na ascite de uma paciente sofrendo de câncer de ovário. (C) Entre pacientes com câncer de ovário avançado (estágio IV), a concentração de $T_{reg}S$ infiltrantes de tumores nas secções do tumor é um forte preditor de uma grande sobrevivência, como indicado por essas curvas de Kaplan-Meier. (A, extraída de E.M. Shevach, *Nat. Med.* 10:900-901, 2004; B e C, extraída de T. Curiel, G. Coukos, L. Zou et al., *Nat. Med.* 10:942-949, 2004.)

pelo sistema complemento do hospedeiro.) Vários outros mecanismos que protegem as células tumorais contra a citotoxicidade dependente do complemento têm sido descritos, embora ainda necessitem ser mais bem-estudados.

15.18 Células tumorais atraem células T regulatórias para se defender do ataque de outros linfócitos

As células T regulatórias ($T_{reg}S$) – um tipo de linfócitos caracterizado mais recentemente (Seção 15.6) – parecem exercer também um papel fundamental na imunoevasão pelas células tumorais. Deve-se lembrar que uma T_{reg} pode inibir diretamente ou ainda destruir tanto as células T auxiliares como as citotóxicas que reconhecem o mesmo antígeno identificado por ela. (Em todos os casos, o reconhecimento antigênico ocorre por meio de receptores de células T [TCRs] que vários desses linfócitos expressam.)

Em indivíduos normais, as $T_{reg}S$ representam apenas 5 a 10% da população de linfócitos $CD4^+$, sendo o restante constituído de células T auxiliares. Em pacientes com câncer, entretanto, esse número pode aumentar para 25 a 30%. Além disso, as $T_{reg}S$ têm sido encontradas, freqüentemente em números maiores, entre os linfócitos que infiltram tumores (TILs) presentes em carcinomas de pulmão, ovário, mama e pâncreas, bem como em tumor ascítico (Figura 15.34A e B). Em conjunto, essas várias observações sugerem que as $T_{reg}S$ exercem um importante papel na regulação da imunidade antitumoral.

Os tumores liberam a quimiocina CCL22 a fim de recrutar T_{reg} S; estas células expressam um receptor de superfície correspondente denominado CCR4. Uma vez presentes na massa tumoral, as T_{reg} S podem suprimir as ações das células T auxiliares que são fundamentais na mobilização de respostas humorais e celulares do sistema imune adaptativo, bem como de células T citotóxicas que são capazes de atacar e eliminar células tumorais (Seção 15.1). Assim, a habilidade de dar início a esses processos imunoevasivos pode ser relacionada com a capacidade do tumor de produzir e secretar CCL22.

A existência de T_{reg} S claramente complica muitas das conclusões determinadas nos últimos anos acerca do papel de linfócitos infiltrantes de tumores (TILs) na patogênese tumoral. Tem sido considerado que esses linfócitos são células T citotóxicas que estão ativamente envolvidas na eliminação de células tumorais adjacentes (veja, como exemplo, a Figura 15.21D). Entretanto, se as T_{reg} S representam uma proporção significativa dos TILs em alguns tumores, então o significado do número total de TILs nesses tumores não é claro. Isso significa que avaliações das *proporções relativas* de células T citotóxicas e T_{reg} S devem ser realizadas a fim de compreender a dinâmica real das interações do tumor com a resposta imune do hospedeiro. Observações como a apresentada na Figura 15.34C podem sugerir que a disfunção de muitos linfócitos T citotóxicos associados a tumores (CTLs) pode ser explicada pela presença de muitas T_{reg} S no seu meio, e essas T_{reg} S podem ser determinantes críticos de como o sistema imune é ou não capaz de manter o crescimento tumoral sob controle.

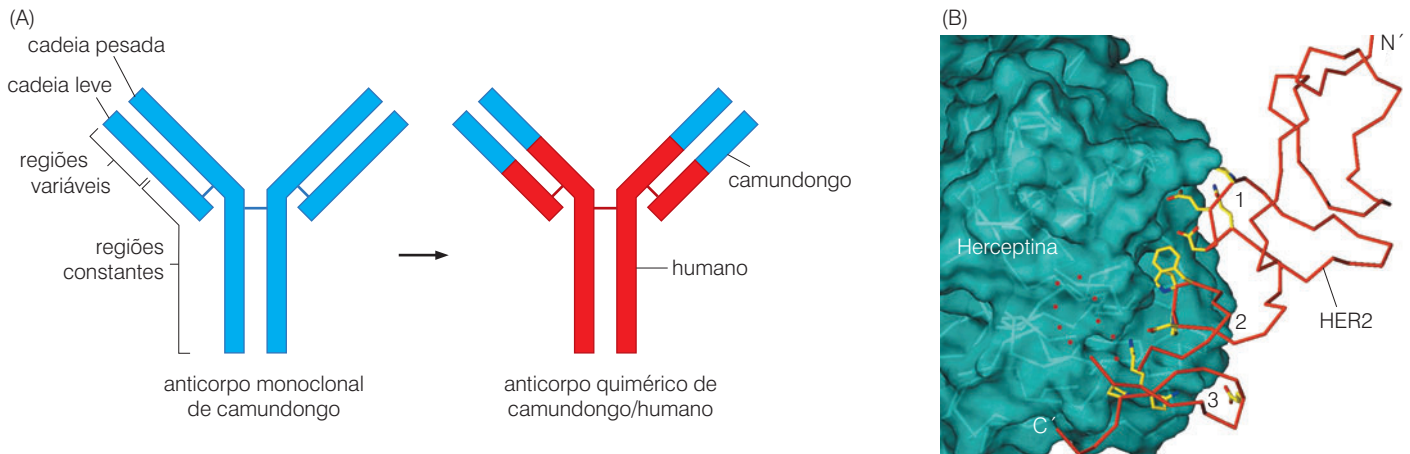
15.19 A imunização passiva com Herceptina pode ser usada para matar células de câncer de mama

Até agora, tem-se discutido bastante sobre a questão da efetividade do sistema imune humano na defesa contra o desenvolvimento espontâneo de tumores. As respostas para essa questão são certamente complexas e continuam a gerar muitas discussões. Entretanto, a resolução dessas discussões não é um pré-requisito para que se responda a uma segunda questão: poderia, o sistema imune de um paciente, ser manipulado de forma a se tornar capaz de eliminar células tumorais que tenham se formado em diversos sítios do organismo?

Dois tipos de intervenção poderiam ser consideradas: seguindo uma estratégia principal, poderia se ativar ou aumentar a capacidade do sistema imune do paciente para montar um ataque contra o tumor que ele apresenta. Isso envolveria o uso de certos fatores *imunoestimulatórios* que podem incitar o desenvolvimento e a proliferação de linfócitos hábeis em iniciar um ataque efetivo. Esse aumento da função imune antitumoral também poderia ser obtido pela exposição dos pacientes a TATAs ou TSTAs expressos pelos seus tumores, imunizando dessa forma o paciente contra o tumor, de maneira semelhante ao que é feito na vacinação contra infecções virais ou bacterianas.

A estratégia terapêutica alternativa envolve várias formas de **imunização passiva**. O uso dessa classe de estratégias implica que o próprio sistema imune do hospedeiro seja incapaz de montar uma resposta imune efetiva, mesmo depois que terapias imunoestimulatórias tenham sido aplicadas, e envolve a administração ao paciente de produtos imunes (p. ex., anticorpos) ou células originadas do sistema imune de um outro organismo. (Os imunologistas reservam o termo “imunização passiva” para procedimentos que envolvem a introdução de anticorpos em um paciente, mas aqui esse termo será empregado de forma mais abrangente.) Quando as células são procedentes do sistema imune de um outro indivíduo, esse procedimento com frequência é chamado de **transferência adotiva**. Inicialmente, serão descritos os vários tipos de imunização passiva, para que então sejam abordadas as estratégias imunoestimulatórias na próxima seção.

O tratamento mais conhecido envolvendo imunização passiva emprega um anticorpo monoclonal chamado **Herceptina**, também denominado trastuzumab pelos seus idealizadores. A Herceptina deriva de um anticorpo monoclonal de camundongos que reage fortemente com



a proteína relacionada ao receptor EGF, denominada HER2, erbB2 ou Neu (Seções 4.3 e 5.6; Tabela 5.2); como descrito anteriormente, esse receptor é superexpresso em 30% dos tumores de mama diagnosticados no ocidente.

Enquanto a proteína HER2 não representa exatamente um antígeno específico de tumores, sua expressão em níveis anormais muito elevados – frequentemente 10 a 100 vezes acima do normal – pode criar uma célula-alvo preferencial para a Herceptina. Essa **seletividade** – eliminação preferencial de células tumorais – deriva diretamente de diferenças entre células normais e tumorais – nesse caso, a superexpressão de HER2 por células de câncer de mama. Essa superexpressão, a qual é normalmente resultante de uma amplificação do gene que codifica o receptor, está associada a um mau prognóstico, envolvendo a progressão da doença durante os anos após o diagnóstico inicial (veja a Figura 4.6).

A fim de produzir a Herceptina, inicialmente foi desenvolvido um anticorpo monoclonal de camundongo (MoAb) contra o HER2. Entretanto, esse anticorpo, assim como todos os anticorpos murinos, não poderia ser utilizado diretamente para terapia em humanos, simplesmente porque a região constante do anticorpo (veja a Figura 15.1), sendo originada de camundongos, constitui um antígeno potente por si só e assim leva o sistema imune humano a produzir altos níveis de anticorpos que ligam e neutralizam as moléculas de anticorpo de camundongo. Além disso, esses anticorpos humanos anticamundongo (HAMAs) podem ocasionalmente induzir choque anafilático em um paciente tratado novamente com um anticorpo de camundongo.

Conseqüentemente, o cDNA que codifica o anticorpo anti-HER2 de camundongos foi remodelado, de forma que a região constante (C) da molécula de anticorpo codificado apresentasse seqüências humanas, em vez de seqüências de camundongos; como esperado, a **quimera** anti-HER2 MoAb resultante (Figura 15.35) não foi imunogênica quando administrada em pacientes. De maneira importante, após essa injeção, foi observado que as moléculas de Herceptina quimerizadas permaneciam na circulação em níveis significativos por mais de um mês, indicando a ausência de qualquer resposta imune do hospedeiro anti-Herceptina, bem como o potencial dos efeitos terapêuticos prolongados. (Uma modificação adicional desse anticorpo, a qual também substitui seqüências de camundongo por seqüências humanas de porções da região variável [V] do anticorpo, que se localiza fora do sítio de combinação do antígeno, resulta em um **anticorpo humanizado**; essa Herceptina humanizada possui ainda menos determinantes antigênicos do que a versão quimérica.)

O uso do anticorpo Herceptina levou a um aumento do tempo de vida de pacientes com câncer de mama cujos tumores superexpressavam a proteína HER2. A Herceptina raramente é utilizada de maneira isolada; em vez disso, é aplicada em combinação com tratamentos quimioterápicos já estabelecidos para o câncer de mama. Em um grande estudo clínico, a adição de Herceptina ao tratamento quimioterápico padrão de mulheres com câncer de mama avançado resultou em um maior tempo para a progressão da doença (7,4 *versus* 4,6 meses com a quimioterapia sozinha), uma taxa reduzida de morte em um ano (22 *versus* 33%) e um tempo global de sobrevida maior (25 *versus* 20 meses).

Figura 15.35 Humanização dos anticorpos terapêuticos (A) Os anticorpos monoclonais (MoAbs) que são produzidos em camundongos em geral não podem ser usados terapeuticamente em humanos por períodos muito longos, porque as regiões constantes das cadeias leve e pesada do anticorpo de camundongo (*figura à esquerda*) são imunogênicas quando introduzidas em humanos, provocando assim a formação de uma resposta séria anti-MoAb nos pacientes tratados, que pode neutralizar as ações do anticorpo MoAb inoculado. Para contornar isso, os cDNAs que codificam as cadeias leve e pesada do MoAb de camundongo (*azul*) são clonados, e os segmentos de DNA codificando os domínios de combinação ao antígeno do MoAb de camundongo, os quais estão localizados nas regiões variáveis das cadeias pesada e leve, são fusionados com os genes que codificam as regiões constantes do anticorpo humano (*vermelho*), produzindo um anticorpo quimérico que não é imunogênico ou, na pior das hipóteses, é fracamente imunogênico. (B) Este estudo de cristalografia de raios X resolve a estrutura detalhada do complexo entre a Herceptina e as moléculas HER2 em uma resolução de 2,5 Å. A superfície do domínio de ligação ao antígeno da Herceptina (vista aqui como o fragmento proteolítico Fab do anticorpo) reconhece e liga um epítipo localizado em um dos quatro subdomínios do ectodomínio do HER2 (*vermelho, figura anexada em amarelo*), denominado subdomínio IV (*direita*); as cadeias laterais dos resíduos HER2 que entram em contato com a Herceptina são mostradas nas figuras anexas em amarelo. Esse subdomínio do HER2 é imediatamente adjacente ao domínio transmembrânico do receptor pelo qual ele passa através da membrana plasmática (veja a Figura 15.38B). (A, adaptada de R.A. Goldsby et al., *Immunology*, 5th Ed. New York: Freeman, 2002; B, extraído de H.S. Cho, K. Mason, K.X. Ramyar et al., *Nature* 421:756-760, 2003.)

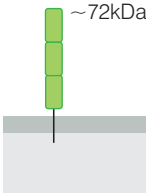
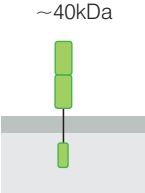
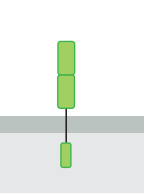
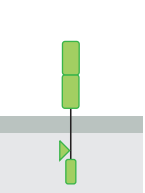
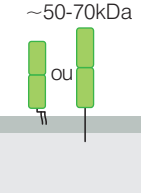
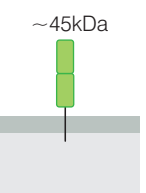
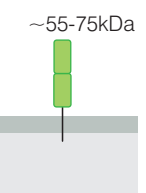
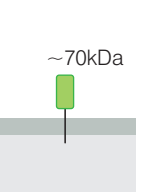
RECEPTOR	FcγRI (CD64)	FcγRII-A (CD32)	FcγRII-B2 (CD32)	FcγRII-B1 (CD32)	FcγRIII (CD16)	FcεRI	FcαRI (CD89)	Fcα/μRI
ESTRUTURA								
LIGAÇÃO	IgG1	IgG1	IgG1	IgG1	IgG1	IgE	IgA1, IgA2	IgA, IgM
TIPO CELULAR	macrófagos neutrófilos eosinófilos células dendríticas	macrófagos neutrófilos eosinófilos células de Langerhans plaquetas	macrófagos neutrófilos eosinófilos	células B mastócitos	células matadoras naturais macrófagos neutrófilos eosinófilos mastócitos	mastócitos eosinófilos basófilos	macrófagos neutrófilos eosinófilos	macrófagos células B

Figura 15.36 Receptores Fc expressos por imunócitos Os receptores de superfície celular Fc (verde) são usados por vários tipos de imunócitos para a ligação a regiões constantes (veja, por exemplo, a Figura 15.3) de moléculas de anticorpo. Uma vez que as moléculas de anticorpo são ligadas aos antígenos de superfície de uma célula-alvo potencial, os receptores Fc então possibilitam que os imunócitos se liguem às regiões

constantes dos anticorpos ligados, iniciando a ativação dos imunócitos e o ataque sobre as células-alvo. Como visto aqui, uma série de variantes do receptor Fc foi desenvolvida pelo sistema imune, com a subclasse de receptores Fcγ, por exemplo, sendo especializada em ligar regiões constantes das moléculas de anticorpo IgG. (Extraída de C.A. Janeway Jr. et al., Immunobiology, 6th Ed., New York: Garland Science, 2005.)

Respostas ainda mais impressionantes foram anunciadas em 2005: mulheres com tumores de mama **operáveis**, mas superexpressando a proteína HER2, foram tratadas no pós-operatório com quimioterapia isolada ou em combinação com Herceptina; a maior parte dessas mulheres apresentava micrometástases nos linfonodos de drenagem (veja a Figura 14.41). Após quatro anos, apenas 15% das mulheres que receberam o tratamento duplo tiveram recidiva, enquanto foi observada recidiva em 33% das mulheres que receberam apenas quimioterapia. É plausível, embora isso não tenha sido provado, que muitos dos efeitos terapêuticos benéficos da Herceptina observados nesse estudo sejam decorrentes da sua capacidade de bloquear a proliferação de células tumorais residuais que persistiram após a remoção do tumor primário; na ausência de Herceptina, essas células poderiam ser responsivas a mitógenos produzidos pelo processo de reparo que se segue após a cirurgia (veja a Barra lateral 13.4).

Os mecanismos precisos pelos quais os anticorpos de Herceptina eliminam células de tumor de mama que superexpressam HER2 ainda continuam sendo um tema de controvérsia. Um mecanismo importante de destruição de células tumorais está relacionado à presença de receptores Fcγ na superfície de uma variedade de células citotóxicas e fagocíticas, incluindo especialmente as células matadoras naturais e os macrófagos (Figura 15.36; veja também a Figura 15.3). Esses receptores se ligam a regiões constantes das moléculas de imunoglobulina γ (IgG) que são expressas na superfícies de outras células, como as células de câncer de mama tratadas com Herceptina. Tal ligação informa as células citotóxicas que expressam o receptor Fcγ da presença de uma célula que deveria ser marcada para eliminação. Assim, células matadoras naturais e macrófagos se tornam ligados a células tumorais que apresentam anticorpos IgG por meio de seus receptores Fcγ, iniciando a eliminação das células tumorais – um processo chamado de citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC).

Linhagens germinativas de camundongos imunocomprometidos foram modificadas por deleção gênica de um receptor Fcγ fundamental. Esses camundongos apresentaram uma capacidade bastante reduzida de eliminar células de câncer de mama humano transplantadas após o tratamento com Herceptina, fornecendo evidências de que a ADCC é um mecanismo-chave para a eliminação de células pela Herceptina. De maneira interessante, a eficácia da terapia com Herceptina parece ser comprometida em certos pacientes com câncer, simplesmente porque eles não apresentam os níveis normais de células matadoras naturais, que são responsáveis pela maior parte da ADCC que ocorre durante a terapia com Herceptina. Analisadas em conjunto, essas várias observações reforçam a idéia de que a maior parte da elimi-

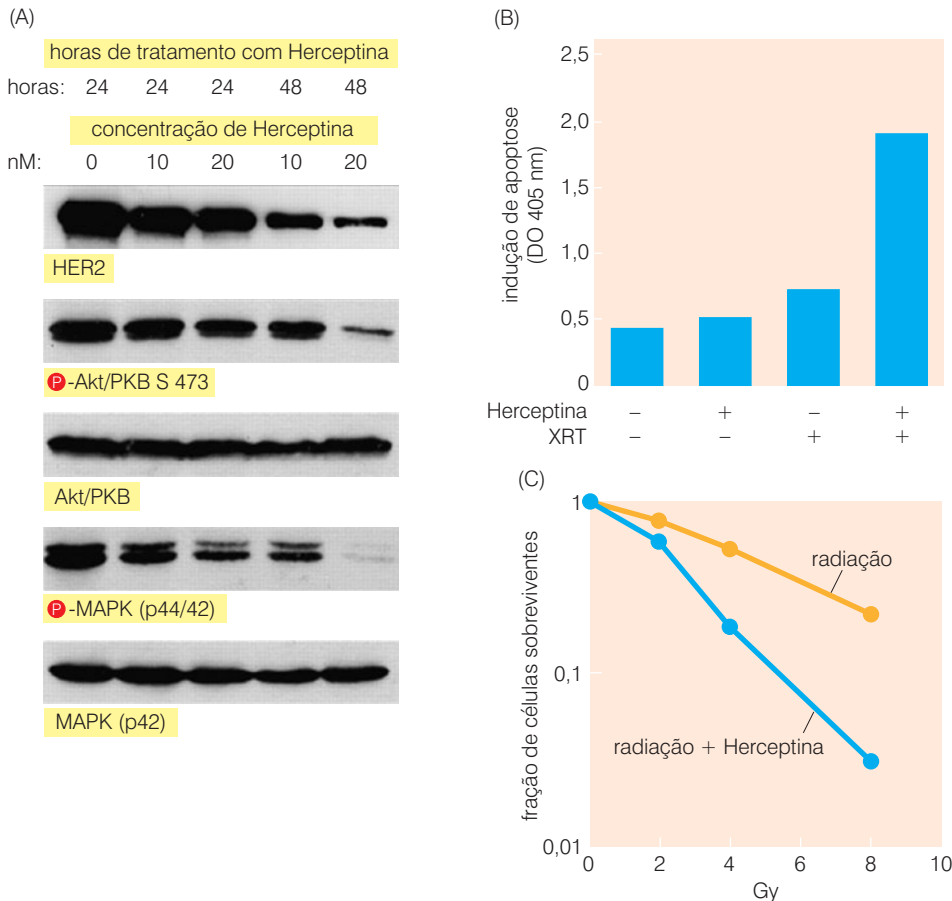


Figura 15.37 Tratamento de células de câncer de mama com Herceptina. A Herceptina tem múltiplos efeitos sobre células tumorais que superexpressam HER2/Neu. No trabalho mostrado aqui, as células tumorais do câncer de mama humano MCF7 foram forçadas a superexpressar a proteína do receptor HER2/Neu. (A) Como consequência da incubação prolongada com Herceptina, os níveis de HER2/Neu diminuíram substancialmente, sendo esse processo proporcional à concentração de Herceptina e à duração do tratamento *in vitro*. Em paralelo, os níveis das cinases Akt/PKB (antiapoptótica) e MAP (mitogênica) (Seções 6.5 e 6.6) ativadas e fosforiladas caíram marcadamente (enquanto os níveis das formas totais dessas duas proteínas não foram alterados.) (B) O tratamento isolado das células tumorais com Herceptina teve um efeito mínimo sobre a extensão de apoptose dessas células. O tratamento com raios X também teve um efeito mínimo. Entretanto, os dois agiram sinergisticamente induzindo apoptose, como indicado na ordenada. (C) Os efeitos colaborativos da Herceptina com a radiação são mostrados; neles, as células tratadas com o anticorpo tiveram uma sensibilidade consideravelmente maior à radiação do que as células não-tratadas. As doses da radiação são fornecidas em cinza (Gy). (Notar que a ordenada é logarítmica.) (Extraída de K. Liang, Y. Lu, W. Jin et al., *Mol. Cancer Ther.* 2:1113-1120, 2003.)

nação de células tumorais induzida pela Herceptina depende das células matadoras naturais e de seus receptores Fc γ . Essa eliminação pode ser aumentada por modificações adicionais da molécula de Herceptina.

Outros mecanismos ainda podem contribuir para os efeitos da Herceptina. Por exemplo, quando muitas proteínas da superfície celular são expostas a anticorpos reativos, essas proteínas são internalizadas e degradadas. O mesmo processo resulta no decréscimo da expressão de HER2 na superfície de células de câncer de mama após a exposição à Herceptina. Essa redução faz com que as células do tumor de mama percam o sinal PI3K cinase e Akt/PKB ativado pelo HER2, que as protege da apoptose, tornando, desta forma, as células tumorais mais suscetíveis à eliminação por radio ou quimioterapia (Figura 15.37).

Também é claro que em muitos tumores de mama, uma vez que o ectodomínio da proteína HER2 é expresso na superfície celular, ele pode ser degradado por proteases extracelulares. A proteína residual que contém o domínio citoplasmático e transmembrânico de tirosina-cinase possui a função de cinase ativada constitutivamente, sendo, assim, uma oncoproteína muito potente (p. ex., veja a Figura 5.11). A clivagem pós-traducional da HER2 que produz esse receptor desregulado pode ser bloqueada pela ligação da Herceptina.

Em adição, outro mecanismo que poderia contribuir para as ações antitumorais da Herceptina pode ser associado a seus efeitos antiangiogênicos: os ligantes do receptor HER2 são conhecidamente liberados pelas células endoteliais a fim de auxiliar no recrutamento de pericitos e células musculares lisas para a formação de capilares. Como visto anteriormente, esse recrutamento é crítico para a maturação dos vasos sanguíneos, incluindo aqueles formados na proximidade do tumor (Seção 13.1). A redução desse recrutamento pela Herceptina poderia explicar seus efeitos antiangiogênicos sobre muitos tumores. Outro anticorpo mono-

Barra lateral 15.4 A Herceptina é apenas o primeiro de muitos anticorpos anti-receptor clinicamente úteis O receptor EGF (EGF-R; HER1) parece estar superexpresso em cerca de um terço de todos os carcinomas humanos e em quase metade dos glioblastomas também. Como no caso do HER2, sua superexpressão aparentemente exerce um papel crucial em prover sinais mitogênicos e antiapoptóticos para as células tumorais. Além disso, uma vez que o HER2 e o EGF-R formam heterodímeros, o último pode ter um papel-chave em direcionar a proliferação de células de câncer de mama que superexpressam HER-2.

Por várias razões históricas, o desenvolvimento de anticorpos monoclonais, notavelmente o Erbitux (também chamado de cetuximab), ficou atrás do desenvolvimento da Herceptina em cerca de três anos. Seu uso clínico para o tratamento de tumores colorretais avançados foi aprovado pelo *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) em 2004. Em longo prazo, anticorpos como o Erbitux podem apresentar uma maior utilidade do que a Herceptina, apenas porque o receptor EGF-R parece participar da patogênese de um número maior de tumores do que HER2.

Figura 15.38 Mecanismos múltiplos de inibição do receptor por anticorpos monoclonais (A) Diferentemente de outros anticorpos anti-receptor, o Erbitux (Fab, amarelo, laranja, painel à esquerda) se liga com uma região do receptor EGF (área circulada) que também está envolvida na interação do ligante pelo EGF (azul-piscina, painel à direita), bloqueando assim a ativação do receptor estimulada pelo ligante. (O anticorpo monoclonal se liga com afinidade 50 vezes maior ao ectodomínio EGF-R do que o ligante EGF). Os domínios de combinação ao antígeno das cadeias leve e pesada da molécula de anticorpo são indicados por VL e VH, respectivamente. Apenas uma porção do anticorpo (incluindo o domínio de combinação ao antígeno), chamada de fragmento Fab, foi analisada nesse estudo de cristalografia de raios X. (B) Quando três complexos anticorpo-receptor distintos são vistos lateralmente e a uma distância maior, torna-se claro que os anticorpos agem sobre os receptores de muitas formas diferentes. Os sítios de ligação específicos das cadeias pesada (azul-piscina) e leve (amarelo) dos vários anticorpos monoclonais anti-receptor foram mapeados, como no painel (A), por cristalografia de raios X. O Erbitux (painel à esquerda), cuja ligação ao domínio III do ectodomínio EGF-R/HER1 foi mapeada com mais detalhes no painel (A), pode ser visto bloqueando o sítio de interação do ligante EGF (comparar a Figura 5.16C). Ao contrário, a Herceptina (painel do meio) se liga ao receptor HER2/Neu de uma forma que permite ao último continuar a formar homo ou heterodímeros com membros da família HER de receptores (HER1, HER2, HER3, HER4; veja também a Figura 15.35B), enquanto um terceiro anticorpo, chamado Omnitarg ou pertuzumab (painel à direita), se liga ao dedo que aponta para a direita no ectodomínio do domínio II de HER2 que é crítico para essa dimerização, bloqueando assim a habilidade de HER2 de formar heterodímeros com outros receptores relacionados. (Como a Herceptina, o Omnitarg pode induzir citotoxicidade celular dependente de anticorpos.) (A, extraída de S. Li, K.R. Schmitz, PD. Jeffrey et al., *Cancer Cell* 7:301-311, 2005; B, extraída de S.R. Hubbard, *Cancer Cell* 7:287-288, 2005.)

clonal que se liga ao HER2 e um anticorpo reativo ao receptor EGF (HER1) também foram desenvolvidos. Eles funcionam diferentemente da Herceptina e podem finalmente apresentar grande utilidade (Barra lateral 15.4).

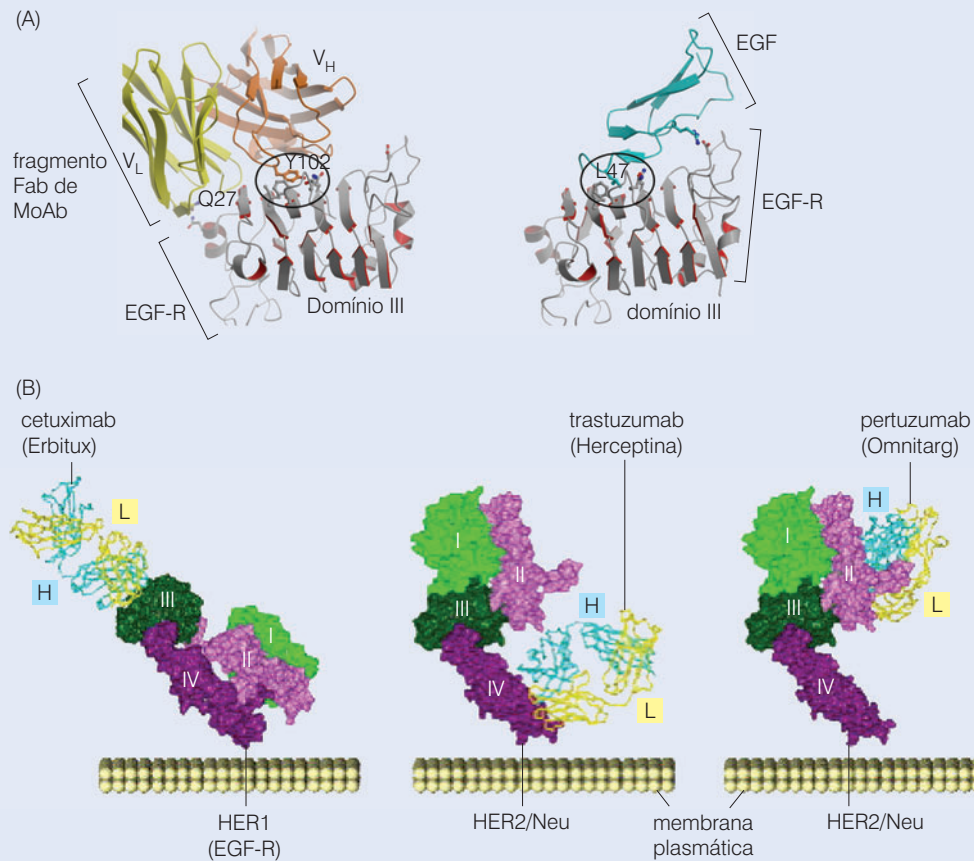
15.20 A imunização passiva com anticorpos pode ser usada para tratar tumores de células B

Uma forma um tanto diferente de imunização passiva antitumoral foi inspirada nas observações de que muitas células de linfoma originadas de células B expressam em sua superfície altos níveis de anticorpos específicos, desenvolvidos pelas células B antecessoras, por meio do rearranjo e da mutação de genes imunoglobulina (Figura 15.93A). Já que esses tumores representam clones pré-crescimento, todas as células B formadoras do tumor vão expressar moléculas de anticorpo idênticas. Enquanto a maioria das seqüências peptídicas desses anticorpos de superfície se origina de regiões constantes das moléculas (e são, portanto, compar-

Como indicado na Figura 15.38, o Erbitux funciona de uma forma bastante diferente da Herceptina, já que parece inibir a ativação de receptores por bloquear a interação do ligante, incluindo a interação de EGF, TGF- α , anfirregulina e outros ligantes do receptor EGF-R. Um terceiro anticorpo, chamado de pertuzumab (Omnitarg), age sobre HER2 bloqueando sua capacidade de formar heterodímeros com outros membros da família EGF-R.

Esses vários anticorpos anti-receptor são mais específicos do que drogas de baixo peso molecular em abolir a sinalização, de forma que

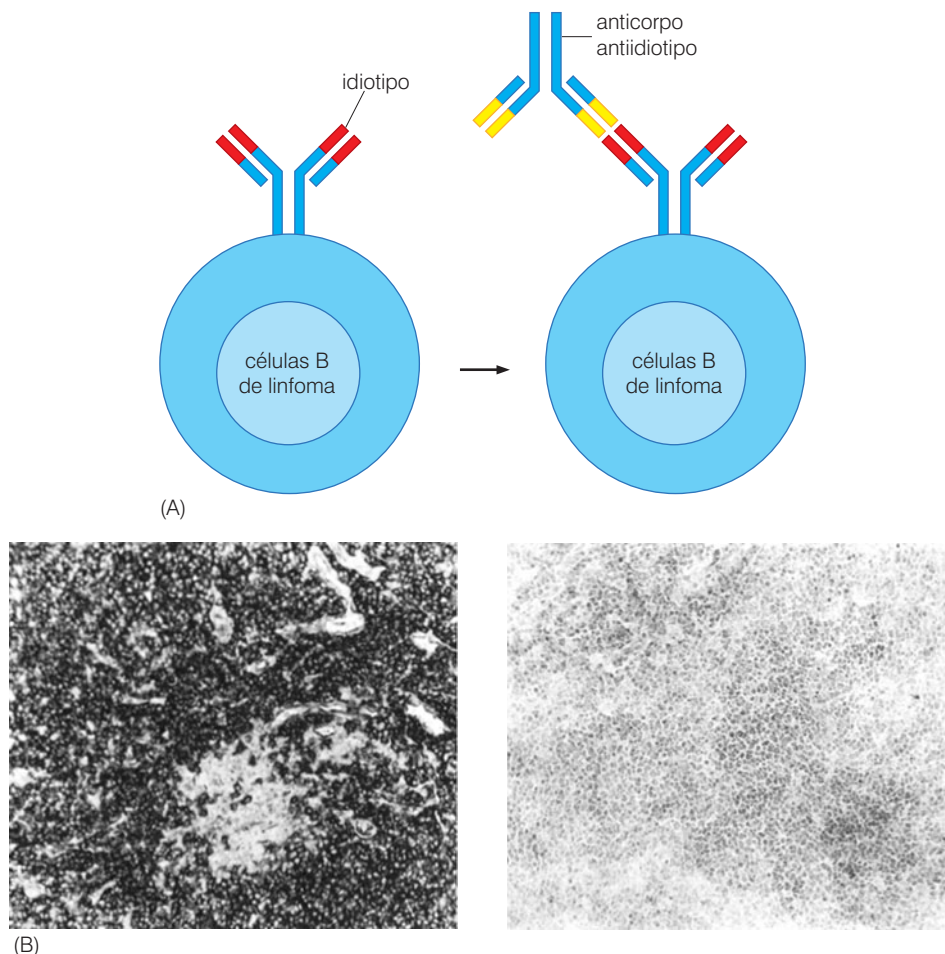
não parecem afetar diretamente receptores tirosina cinase (RTKs) não-relacionados. Entretanto, eles podem não ser capazes de alcançar o interstício dos tumores de forma tão efetiva quanto os antagonistas RTK de baixo peso molecular (a ser discutido no Capítulo 16). Ainda mais importante, vários tumores humanos expressam versões truncadas do EGF-R que não apresentam o ectodomínio e são ativados constitutivamente (de forma independente do ligante); essas proteínas perderam os determinantes antigênicos que são reconhecidos pelos anticorpos monoclonais anti-receptor e, assim, contornam a inibição por esses anticorpos.



tilhadas com outros anticorpos da mesma classe), as seqüências de aminoácidos dos domínios de combinação com o antígeno representam antígenos únicos e exclusivos, os quais são chamados de **idiotipos**.

Assim, anticorpos antiidiotipos são produzidos para o reconhecimento específico de moléculas de anticorpo expressas na superfície de um clone de células B malignas. Isso levou à criação de moléculas de anticorpo antiidiotipo com a finalidade de tratar tumores de células B. Em um caso específico, um anticorpo monoclonal antiidiotipo de camundongo foi desenvolvido contra uma molécula de anticorpo expressa na superfície das células de linfoma de um paciente. Um pequeno número de injeções do anticorpo monoclonal resultou em uma fase bastante longa de remissão nesse paciente, que já havia desenvolvido um quadro bastante avançado da doença e que tinha uma expectativa de vida bastante curta. A estratégia de usar anticorpos antiidiotipos contra vários tumores envolvendo células da linhagem B resultou em muitas respostas em cerca de 50 pacientes que foram tratados.

Figura 15.39 Terapia antiidiotipo de linfomas de células B (A) Linfomas de células B derivam de células B que desenvolveram a capacidade de produzir moléculas de anticorpo com sítios de ligação ao antígeno altamente específicos, nas suas regiões variáveis (*vermelho*). (A molécula imunoglobulina de superfície celular que essas células expressam é da classe IgM e é expressa, nesse estágio de desenvolvimento, como uma molécula de superfície celular transmembrânica, sendo configurada mais como um receptor de fator de crescimento.) As seqüências de aminoácidos no domínio de combinação ao antígeno do receptor constituem um *idiotipo*, que pode ser considerado um antígeno, uma vez que os anticorpos monoclonais antiidiotipo podem ser produzidos, podendo reconhecer especificamente células B que expressam um idiotipo IgM particular sobre sua superfície. (B) Anticorpos monoclonais antiidiotipo (MoAbs) foram produzidos contra uma série de linfomas. Aqui, o linfoma de um paciente (*painel à esquerda*) é mostrado estando fortemente imunomarcado pelo MoAb produzido contra o idiotipo de suas células tumorais. (Uma ilha de células T no meio das células do linfoma em um linfonodo não está corada.) Por outro lado, os MoAbs produzidos contra os idiotipos de 10 outros linfomas não marcaram o linfoma desse paciente, um exemplo dos quais é mostrado aqui (*painel à direita*). (B, extraída de K. Thielemans, D.G. Maloney, T. Meeker et al., *J. Immunol.*, 133:495-501, 1984.)



Essa estratégia terapêutica pareceu bastante interessante devido à sua seletividade, já que anticorpos antiidiotipo reconhecem apenas as células tumorais do paciente, enquanto não são capazes de reconhecer as moléculas de anticorpo expressas por todos os outros clones de células B do sistema imune do paciente. Assim, cada célula tumoral do paciente apresenta um único idiotipo, isso porque (1) todas as células tumorais B são originadas de uma única célula B normal; (2) essa célula B normal existe entre milhões de clones de células B distintos em um sistema imune normal, cada um expressando seu próprio anticorpo exclusivo; e (3) o progenitor normal do clone de células tumorais é selecionado a partir de várias classes de células B normais por meio de um processo essencialmente randômico. Isso significa que um anticorpo monoclonal antiidiotipo precisa ser desenvolvido de forma específica para cada paciente portador de um câncer de células B (Figura 15.39B). Esses fatores ajudam a explicar por que, finalmente, essa estratégia não foi economicamente viável, uma vez que um grande custo está associado à produção de anticorpos contra o tumor de cada paciente em particular.

Uma estratégia terapêutica alternativa foi então adotada: foi desenvolvido um anticorpo monoclonal que se liga ao CD20, um antígeno bastante expresso na superfície celular. O CD20 é expresso em vários estágios da diferenciação de células B e em tumores derivados dessas células (Figura 15.40). O anticorpo monoclonal chamado de Rituxan ou rituximab foi humanizado a fim de reduzir as possíveis reações imunológicas dos pacientes injetados com moléculas de Rituxan. Demonstrou-se que o Rituxan pode ser útil para o tratamento de muitos linfomas não-Hodgkin (NHLs), entre outros, os quais constituem a 5ª e a 6ª causa mais frequente de morte associada a câncer em homens e mulheres americanos, respectivamente. (Mais de 90% dos NHLs de células B expressam o antígeno CD20.)

O tratamento de pacientes com doses semanais de Rituxan tem sido efetivo no tratamento de cerca de metade dos pacientes com linfoma não-Hodgkin folicular *reincidente* (i. e., tumores

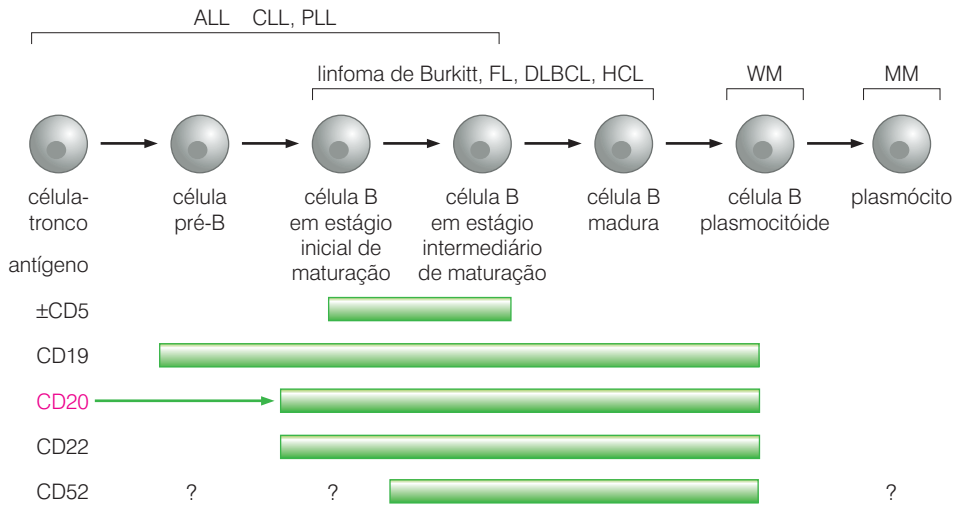


Figura 15.40 Rituxan e o tratamento de tumores de células B A aplicabilidade do anticorpo monoclonal Rituxan/rituximab se origina, em parte, do fato de que o antígeno CD20 que ele reconhece é expresso como uma proteína transmembrânica da superfície celular por células B em vários estágios de diferenciação, começando com células B em estágio de maturação e continuando pela formação de células B plasmocitóides, os precursores imediatos dos plasmócitos secretores de anticorpos. As barras verdes indicam os estágios de diferenciação que expressam os antígenos indicados. Por exemplo, o CD20 é expresso por células B em estágio de maturação e por todos os tipos celulares subsequentes, incluindo as células B plasmocitóides. Como indicado aqui, uma variedade de tumores da linhagem de células B, incluindo o linfoma de Burkitt, o linfoma folicular (FL), o linfoma de células B grandes difusas (DLBCL), a leucemia de células cabeludas (HCL) e a macroglobulinemia de Waldenström (WM), os quais fenocopiam as características de células B em vários estágios discretos de diferenciação também expressam esse antígeno, fazendo do Rituxan um agente altamente útil para tratar essas diversas leucemias. Significativamente, a maioria dos mielomas múltiplos (MMs) não mais expressam o antígeno CD20, porque eles mimetizam o padrão de expressão gênica de plasmócitos altamente diferenciados, o que explica por que o Rituxan não é efetivo no tratamento desses tumores. O fato de que outros tipos de antígeno de superfície celular (p. ex., CD19) têm uma expressão igualmente ampla, senão maior, sugere que os anticorpos contra esses outros antígenos podem, um dia, ser terapeuticamente úteis. (Cortesia de R. Levy.)

que cresceram novamente depois de tratamentos que apresentaram sucesso inicialmente) ou casos **refratários** desses tumores (i. e., tumores que se tornaram não-responsivos a outros tipos de regimes de tratamento). De forma interessante, as populações de linfócitos B normais desses pacientes tratados com o MoAb também foram eliminadas e só retornaram 6 a 9 meses depois. De qualquer maneira, essa perda da função das células B normais e a imunossupressão associada, em conjunto com outras conseqüências transitórias do tratamento com rituximab, representam efeitos colaterais menores e aceitáveis.

Em 2003, o Rituxan foi usado no tratamento de mais de meio milhão de pessoas no mundo acometidas por tumores malignos de células B. Em muitos casos, tem sido extremamente útil como um adjuvante para o tratamento já disponível. Por exemplo, a adição de Rituxan ao tratamento quimioterápico padrão do linfoma grande difuso da célula B (DLBCL) – um protocolo empregando um coquetel de quatro drogas denominado CHOP – resultou em um decréscimo de 41% no risco de progressão e mortalidade da doença. Uma modificação similar do protocolo CHOP para o tratamento de linfoma folicular produziu uma redução de 66% nas falhas de tratamento.

Enquanto o tratamento com esse anticorpo monoclonal foi eficaz em estabilizar a doença e, assim, prolongar a sobrevida, ele não é curativo, e virtualmente todos os pacientes apresentam recidivas dentro de vários anos. Os tumores reincidentes de alguns pacientes respondem a um segundo ciclo de tratamento com Rituxan, enquanto outros podem desenvolver resistência. Até agora os mecanismos precisos dessa resistência ainda não são bem-compreendidos; dentre os mecanismos propostos, estão alterações da expressão CD20, resistência elevada à apoptose, perda da atividade do complemento e perda das células imunes capazes de mediar a citotoxicidade. Provocativamente, a bagagem genética dos pacientes sob tratamento tem uma forte influência sobre o sucesso do tratamento com Rituxan (Barra lateral 15.5).

Rituxan e Herceptina – ambos usados na clínica – representam a vanguarda de um grupo muito maior de anticorpos terapêuticos que se encontra em vários estágios de pesquisa e desenvolvimento (veja, por exemplo, a Figura 15.38). Em geral, quando a Herceptina ou o Rituxan são utilizados isoladamente, há sucesso no aumento da expectativa de vida dos pacientes em vários meses, algumas vezes em muitos anos. Esse fato, associado ao rápido acúmulo de evidências clínicas, torna claro que terapias com anticorpos monoclonais como esses são mais efetivas quando usadas em conjunto com outras terapias anticâncer, com as quais eles podem agir sinergisticamente, induzindo remissões duráveis e, possivelmente, no futuro, curas.

A pesquisa de anticorpos monoclonais também tomou outra direção: muitos experimentos exploraram a possibilidade de aumentar os efeitos citotóxicos dessas moléculas de anticorpo. Até agora, foi discutido o fato de que uma molécula de anticorpo pode se ligar à superfície de

Barra lateral 15.5 Fatores genéticos e não-genéticos são fortes determinantes da efetividade do tratamento com Rituxan. Como discutido anteriormente, a morte de células-alvo tumorais mediada pela citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC) está relacionada à capacidade de células citotóxicas, como as células matadoras naturais, de usar seus receptores $\text{Fc}\gamma$ para se ligar a células tumorais cujas superfícies tenham sido marcadas com moléculas de imunoglobulina γ (anticorpo IgG) (veja as Figuras 15.3 e 15.6). Um importante receptor $\text{Fc}\gamma$ de células matadoras naturais humanas, chamado de $\text{Fc}\gamma\text{RIIIa}$, é encontrado em duas formas variantes polimórficas, as quais possuem uma valina (V) ou uma fenilalanina (F) na posição 158. A variante V do $\text{Fc}\gamma\text{RIIIa}$ apresenta uma afinidade significativamente maior para a ligação de moléculas IgG humanas do que a variante F, e, certamente, células citotóxicas que possuem a variante V do $\text{Fc}\gamma\text{RIIIa}$ são mais efetivas na ADCC do que aquelas que apresentam a variante F.

As respostas clínicas de um paciente ao tratamento com Rituxan são dramaticamente afetadas pelo tipo de receptor $\text{Fc}\gamma$ expresso por suas células matadoras naturais. Assim, pacientes com linfoma de células B que eram homozigotos para o alelo V (genótipo VV) e foram

tratados com rituximab, apresentaram um tempo médio de progressão (tempo entre o tratamento inicial e a recorrência da doença) de 534 dias, enquanto aqueles que eram homozigotos para o alelo F (genótipo VF ou FF) tiveram um tempo de progressão de 170 dias. Variantes polimórficas de um segundo receptor $\text{Fc}\gamma$, chamado de $\text{Fc}\gamma\text{RIIa}$, também têm um forte efeito na resposta terapêutica. Assim, além das influências do fenótipo das células tumorais, os resultados da imunoterapia também são marcadamente afetados pela constituição genética dos pacientes sob tratamento, nesse caso, de um gene que determina a estrutura de um receptor Fc.

Ademais, outros fatores predizem se ou como os pacientes vão responder à terapia com Rituxan. Por exemplo, quando os níveis séricos de Rituxan são medidos em pacientes sob tratamento, aqueles que mantêm altos níveis por períodos mais prolongados são mais propensos a mostrarem uma resposta clínica favorável (Figura 15.41). Isso destaca uma limitação dos tratamentos baseados em anticorpos monoclonais e uma questão não-solucionada no desenvolvimento de imunoterapêuticos: ainda não se compreendem os mecanismos biológicos que determinam o tempo de duração dos anticorpos monoclonais na circulação.

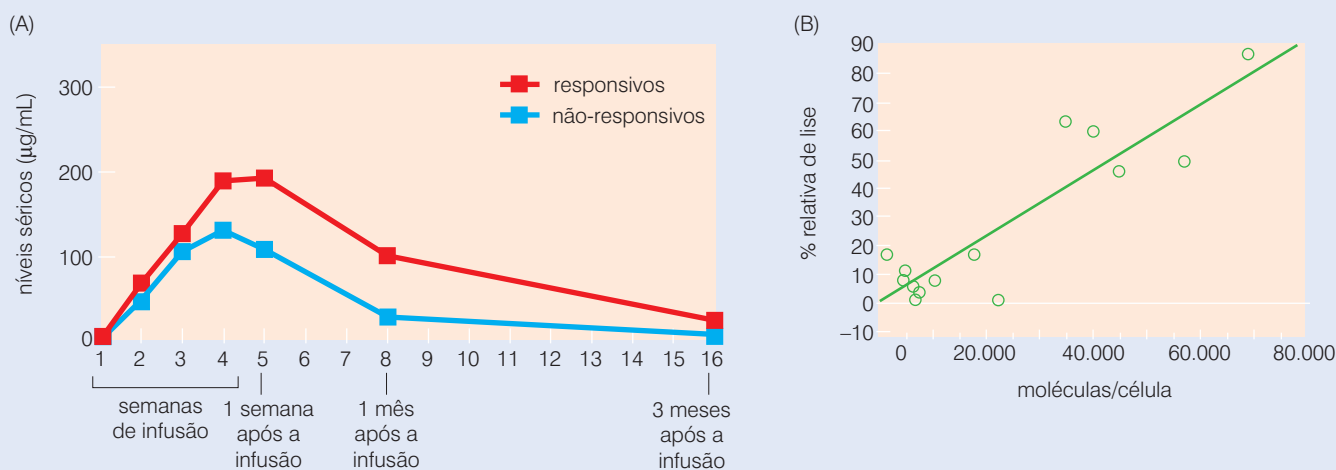


Figura 15.41 Determinantes de sucesso do tratamento com Rituxan. (A) O perfil temporal da persistência de um agente terapêutico na circulação – sua farmacocinética (PK) – freqüentemente determina seus efeitos terapêuticos. Como mostrado aqui, o Rituxan foi injetado em um grupo de pacientes com leucemia e linfoma em intervalos regulares em um período de quatro semanas, e os níveis séricos de Rituxan foram acompanhados durante esse tempo e pelos próximos três meses. A PK do Rituxan foi marcadamente diferente entre aqueles que mostraram ou não respostas clínicas claras a esse anticorpo monoclonal. Esse comportamento sugere que algum tipo de “depósito de antígenos” ocorre em certos pacientes que absorvem o Rituxan disponível, acelerando assim seu desaparecimento da circulação e comprometendo sua efetividade

terapêutica. (B) Um outro parâmetro importante que governa o sucesso da terapia com Rituxan parece ser representado pelos níveis de CD20 que são expressos pelos vários tipos de tumores (veja a Figura 15.40). Os níveis de expressão de superfície celular de CD20 foram medidos em um conjunto de amostras de leucemia recém-isoladas (leucemias linfocítica crônica e pró-linfocítica, ambas da linhagem de células B). Como mostrado aqui, a suscetibilidade desses vários tumores à lise na presença de Rituxan mais complemento varia dramaticamente, dependendo do número de moléculas CD20 que são expressas por célula de cada uma das amostras de tumor. (A, extraída de N.L. Bernstein, A.J. Grillo-Lopez, C.A. White, et al., *Ann. Oncol.* 9:995-1001, 1998; B, extraída de J. Golay, M. Lazzari, V. Facchinetti et al., *Blood* 98:3383-3389, 2001.)

uma célula tumoral e produzir a morte celular por meio de efeitos do sistema complemento ou de células citotóxicas que apresentem receptores Fc. Uma alternativa interessante seria ligar as moléculas de anticorpo a agentes tóxicos, criando assim **imunotoxinas** que são guiadas como “bombas inteligentes” ao tumor, onde são apresentadas altas concentrações de toxina às células-alvo. Por exemplo, moléculas de anticorpo podem ser ligadas *in vitro* a substâncias biológicas altamente tóxicas, como a cadeia A da ricina ou uma toxina produzida pela bactéria *Pseudomonas*, sendo utilizadas para conduzir essas toxinas até o tumor.

Uma segunda abordagem utiliza moléculas radioativas que são ligadas a anticorpos antes da aplicação em pacientes com câncer. A estratégia, nesse caso, é que a radioatividade mate as células tumorais adjacentes. Uma variação envolve a conjugação de quimioterápicos altamente potentes, como a adriamicina, às moléculas de anticorpo.

Em uma terceira estratégia, enzimas específicas são ligadas a moléculas de anticorpo; essas enzimas são capazes de converter **pró-drogas** não-tóxicas em drogas ativamente tóxicas. Uma vez que o anticorpo e a enzima de ativação se encontram concentrados na massa tumoral, a pró-droga pode ser injetada no paciente, tornando-se ativada pelas enzimas nas proximidades do tumor. A vantagem dessa estratégia está baseada no fato de que a enzima pode gerar centenas, possivelmente milhares, de moléculas de drogas tóxicas perto das células-alvo, amplificando assim os efeitos tóxicos de uma simples molécula de anticorpo monoclonal. Essas várias aplicações de moléculas de anticorpos monoclonais como vetores para tumores são a base de pesquisas intensas e de desenvolvimento.

15.21 A imunização passiva pode ser obtida pela transferência de imunócitos de um indivíduo para outro

Uma forma um tanto diferente de imunização passiva envolve o transplante de medula óssea (BMT). O racional desse tratamento está baseado na descoberta de que o sistema imune de camundongos ou de humanos pode ser **neutralizado** (eliminado) por meio de tratamentos com drogas ou irradiação X. A medula transplantada, por conter células-tronco hematopoiéticas (HSCs), pode repovoar a medula óssea do receptor e regenerar todas as linhagens celulares necessárias para a hematopoiese normal e a função imune.

No caso de muitos tumores hematopoiéticos, notavelmente linfomas e leucemias, a intenção do transplante de medula seria de livrar o organismo das células-tronco neoplásicas presentes em todo o corpo, de forma especial na própria medula. De acordo com essa linha de pensamento, esse transplante de medula (BMT) poderia prevenir a auto-regeneração do tumor, uma vez que as células-tronco seriam eliminadas da medula do paciente.

Quando essa estratégia de BMT foi empregada pela primeira vez, acreditava-se que o melhor doador seria aquele cujo complexo de histocompatibilidade de antígenos fosse o mais próximo possível ao do receptor. Isso permitiria um repovoamento mais efetivo da medula óssea e minimizaria o provável ataque sobre os tecidos do receptor por células imunes provenientes do transplante. Entretanto, com o passar do tempo, se tornou claro que um nível mínimo de *histoincompatibilidade* entre o doador e o receptor seria de fato desejável.

Como já visto, a maior parte do efeito terapêutico dos transplantes de medula óssea para o tratamento de neoplasias hematopoiéticas é originado das respostas do transplante *versus* o tumor (GvT), nas quais os imunócitos do doador identificam e atacam as células tumorais residuais – aquelas que sobreviveram à radiação ou à quimioterapia utilizadas para destruir a medula óssea do paciente. Esse ataque é presumivelmente provocado por causa da expressão de antígenos pelas células tumorais do paciente que não são familiares às células imunes do transplante. No momento, essa resposta GvT é o único mecanismo verdadeiramente efetivo para obter períodos de cura duráveis para a leucemia mielóide crônica (CML). (Por razões que ainda não estão esclarecidas, a reação GvT em geral não é acompanhada de uma reação transplante *versus* hospedeiro de severidade comparável, a qual poderia, caso ocorresse, levar a uma reação inflamatória abrangente e à destruição de vários tecidos normais do receptor por células do sistema imune do doador.)

Aqui, mais uma vez, pode-se observar um exemplo em que a incapacidade do próprio sistema imune do paciente em montar uma resposta antitumoral efetiva pode ser contornada pela introdução de produtos de um sistema imune estranho – nesse caso, imunócitos, que são freqüentemente capazes de fazer um ataque massivo das células tumorais do hospedeiro.

Infelizmente, por várias razões, o transplante de medula óssea não tem se mostrado como uma abordagem efetiva para o tratamento de pacientes com tumores sólidos (além dos hematopoiéticos).

15.22 Os sistemas imunes dos pacientes podem ser mobilizados para atacarem seus tumores

Outra grande classe de imunoterapias para o câncer depende da mobilização e da potencialização das defesas imunes endógenas dos pacientes. Deve estar implícito que os seus sistemas imunes são intrinsecamente capazes de atacar e eliminar os tumores e que as respostas imunes antitumorais agressivas podem ser ativadas pelo aumento do número e da atividade de várias células imunes citotóxicas.

(Essas estratégias são comumente consideradas como novos tipos de “vacinas” anticâncer. O termo é impreciso, uma vez que vacinas são consideradas como substâncias para a *prevenção*, muito mais do que para o *tratamento* de uma doença já existente. Isso explica o porquê da crença de que esse tipo de imunoterapia em desenvolvimento traria a promessa de efeitos preventivos – um objetivo que está longe daquele almejado por aqueles que estão envolvidos no desenvolvimento de imunoterapias antitumorais.)

Os esforços contínuos e intensivos no desenvolvimento de novos protocolos imunoterapêuticos dependem, em grande parte, dos avanços no conhecimento da função imune ao nível celular e molecular. Muitos desses projetos visam o conhecimento de moléculas sinalizadoras que são utilizadas naturalmente pelo sistema imune para regular os seus próprios efeitos. Curiosamente, uma forma altamente efetiva de mobilização do sistema imune tem sido usada por muitos anos para tratar com sucesso os estágios iniciais de câncer de bexiga, sem que haja o completo entendimento do seu funcionamento (Barra lateral 15.6).

Uma estratégia importante para mobilizar a resposta antitumoral depende da ativação de células dendríticas (Seção 15.2). Essas células apresentadoras de antígeno (APCs) são normalmente encarregadas de ingerir agentes infecciosos e outras partículas antigênicas (incluindo células tumorais) pelos tecidos do corpo, retornando posteriormente aos linfonodos de drenagem adjacentes, nos quais utilizam suas moléculas MHC de classe II para apresentar fragmentos oligopeptídicos do material fagocitado a células T auxiliares (veja a Figura 15.8). Células dendríticas são funcionalmente ativadas pela exposição ao fator de crescimento chamado GM-CSF (fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos).

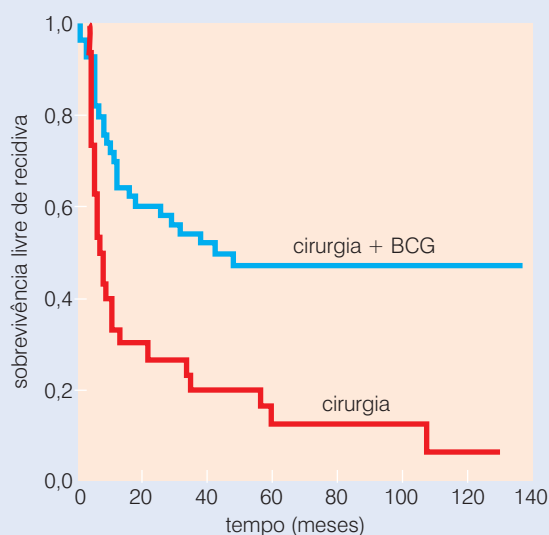
Com essas interações em mente, alguns pesquisadores cultivaram células tumorais obtidas de pacientes *ex vivo* (i. e., fora do organismo) e forçaram essas células a expressarem GM-CSF, por meio da introdução de um vetor de expressão. As células resultantes modificadas foram então reintroduzidas no paciente, com o intuito de fazer com que elas atraíssem e ativassem células dendríticas da proximidade. Idealmente, as células dendríticas ativadas poderiam então voltar aos linfonodos regionais, estimulando as células T auxiliares que poderiam então iniciar uma resposta antitumoral intensa.

Como uma manipulação alternativa, os precursores das células dendríticas poderiam ser obtidos do sangue e induzidos a se diferenciarem em células funcionais por meio da incubação de um coquetel de fatores de crescimento, especificamente, GM-CSF, TNF (fator de necrose tumoral) e IL-4 (interleucina-4). O objetivo seria incubar as populações resultantes de células dendríticas na circulação de pacientes com câncer, esperando que elas atingissem os linfonodos e apresentassem os antígenos tumorais adquiridos para as células T auxiliares, mobilizando, assim, uma resposta imune antitumoral efetiva.

Uma estratégia ainda mais direta seria forçar as células dendríticas de um paciente a expressarem ou processarem proteínas antigênicas associadas a tumores. A expectativa, nesse caso, é de que as células dendríticas, após a reintrodução no organismo de um paciente com câncer,

Barra lateral 15.6 Bactérias podem ser usadas para tratar câncer de bexiga

O uso de bactérias para tratar tumores remonta ao final do século XIX, quando William Colley, um cirurgião de Nova Iorque, observou que os tumores freqüentemente regrediam em pacientes que tinham (e se recuperavam de) infecções bacterianas de pele. Isso levou a muitas décadas de pesquisa intensa com base no uso de bactérias vivas ou mortas como agentes indutores de uma resposta imune contra eles próprios e quaisquer células tumorais que estivessem presentes no orga-



nismo. Essas tentativas ficaram de lado, com uma exceção, envolvendo o bacilo Calmette-Guérin (BCG), uma cepa atenuada (enfraquecida) de micobactéria que foi originalmente desenvolvida como uma vacina contra tuberculose.

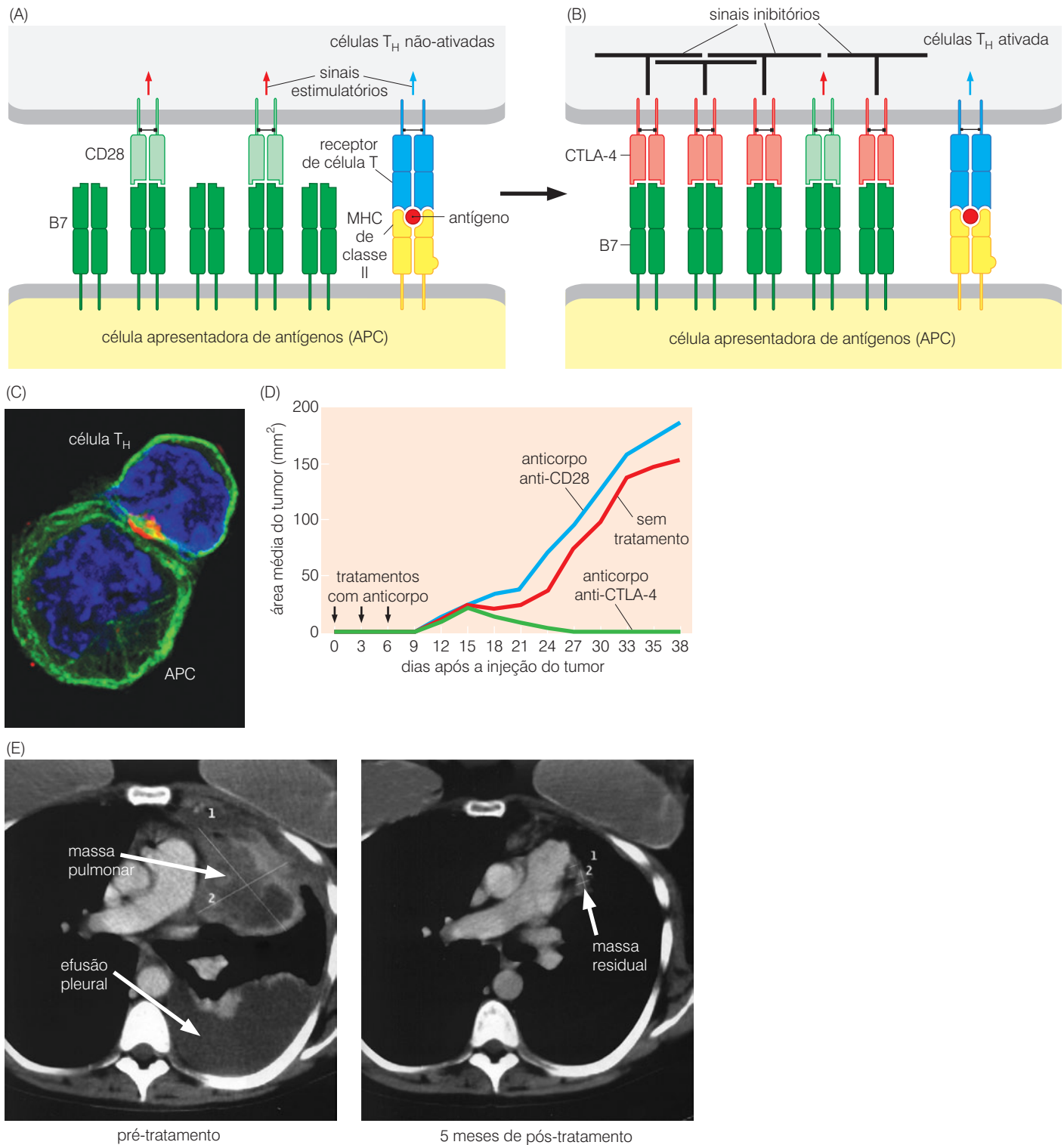
A BCG é freqüentemente injetada em pacientes sofrendo de carcinomas de bexiga em estágio inicial. É comumente efetiva em parar ou retardar a progressão desses tumores, constituindo um tratamento que é bem menos traumático do que a cirurgia ou a radiação (Figura 15.42). O tratamento com BCG claramente funciona por sua capacidade de atrair imunócitos – incluindo linfócitos T_H $CD4^+$ e T_C $CD8^+$, bem como macrófagos e células matadoras naturais – para a bexiga, na qual essas células iniciam respostas inflamatórias localizadas. Entretanto, os mecanismos precisos da ação antitumoral da BCG permanecem obscuros.

Figura 15.42 Aumento da resposta imune por BCG O uso do bacilo Calmette-Guérin (BCG), uma micobactéria atenuada, como um imunoestimulante, tem efeitos claros na prevenção da progressão de carcinomas de bexiga humanos. Dentre os pacientes que foram tratados apenas cirurgicamente (*linha vermelha*) por meio do procedimento conhecido como ressecção transuretral, a proporção de pacientes livres de recidivas (*ordenada*) declinou de maneira marcada durante os meses após o tratamento (*abscissa*), como indicado pela curva de Kaplan-Meier. Por outro lado, dentre aqueles pacientes que foram tratados cirurgicamente e foram adicionalmente expostos a BCG, que foi injetada em suas bexigas (*linha azul*), a frequência de recidivas foi muito menor, e alguns pacientes permaneceram livres de recidivas por mais de cinco anos. (Extraída de J. Patard, S. Moudouni, F. Saint et al., *Urol.* 58:551-556, 2001.)

passassem a estimular os linfócitos T_H e T_C , ativando assim as respostas imunológicas antitumorais. Uma diversa gama de protocolos experimentais tem sido utilizada para testar essa abordagem. Dentre esses protocolos, destaca-se a transfecção de mRNA de células tumorais para células dendríticas, bem como a exposição de células dendríticas a certas proteínas tumorais ou peptídeos antigênicos, a corpos apoptóticos derivados de células tumorais, a lisados de células tumorais ou, ainda, a populações de células tumorais irradiadas. Em alguns casos, o uso de uma ou mais dessas estratégias resultou em um aumento significativo do tempo de vida de pacientes com câncer em estágio avançado, notavelmente de melanomas (estágio IV). É possível que essas taxas de sucesso nos protocolos de imunoterapia futuros para o câncer sejam bastante aumentadas pelo uso de células dendríticas maduras, em vez de DCs imaturas, que têm sido utilizadas na maior parte dos ensaios clínicos até agora.

As respostas de linfócitos T, especificamente de células T_H e T_C , a antígenos oligopeptídicos que são expressos por células dendríticas apresentadoras de antígenos (APCs) podem também ser aumentadas de várias formas. Em detalhes, as respostas desses linfócitos T à apresentação antigênica por células dendríticas acontece, em geral, por meio de duas fases.

Durante a primeira fase (Figura 15.43A), o encontro inicial de linfócitos T com APCs induz vários tipos de respostas por parte dos linfócitos, que são mediadas pelos receptores de superfície CD28 de linfócitos T; os receptores CD28 participam do processo de apresentação de antígenos, em conjunto com os receptores de células T (TCR), sendo que estes últimos são responsáveis pelo reconhecimento antigênico. Subseqüentemente, durante a segunda fase (Figura 15.43B), uma outra classe de receptores de linfócitos T, denominados CTLA-4 (antígeno 4 de linfócitos T citotóxicos), são produzidos pelas células T, os quais também se movem em direção aos receptores de células T (Figura 15.43C), reduzindo de forma marcante a estimulação de linfócitos T pelas células dendríticas apresentadoras de antígeno. Assim,



o receptor CTLA-4 é responsável por uma alça de retroalimentação negativa, a fim de assegurar que a ativação das células T seja apenas transitória e que as respostas imunes resultantes sejam limitadas.

Anticorpos monoclonais que ligam e neutralizam os receptores CTLA-4 inibitórios parecem potencializar de forma marcante as respostas imunes mediadas por linfócitos T, principalmente porque esses anticorpos prolongam e intensificam a ativação de linfócitos induzida

Figura 15.43 Modulação CTL-4 da resposta imune celular A interação de um linfócito T_H (*acima*) com uma célula apresentadora de antígenos (APC, *abaixo*), como a célula dendrítica, acontece em duas fases. (A) Inicialmente, a proteína de superfície CD28 (*verde-claro*) expressa pelo linfócito T_H anexa proteínas B7 complementares (*verde-escuro*) sobre a superfície da APC. Isso faz com que as moléculas CD28 liberem sinais co-estimulatórios (*setas vermelhas*) que agem em conjunto com os sinais (*setas azuis*) liberados pelo receptor de células T de ligação ao antígeno (*azul*) para induzir a ativação das células T_H . Na segunda fase, a célula T, como parte do seu programa de ativação, começa a sintetizar moléculas CTLA-4 (*cor-de-rosa*). Essas moléculas CTLA-4 ligam as moléculas B7 da APC com maior afinidade do que as moléculas CD28, deslocando assim o CD28 de sua associação e abolindo a ativação adicional de células T. (O termo “B7” engloba duas moléculas que agem similarmente, chamadas B7-1 e B7-2.) (C) Como visto aqui, quando uma APC e um linfócito T interagem, as moléculas CTLA-4 (*laranja-avermelhado*) se tornam concentradas na *sinapse* (interface) entre elas. (D) A modulação da atividade CTLA-4 pode ter efeitos substanciais na resposta imune contra um tumor implantado. Na ausência de qualquer intervenção, células de carcinoma singênicas crescem vigorosamente, começando nove dias após a implantação de células tumorais em um camundongo hospedeiro (*linha vermelha*). O soro anti-CD28, que deveria interferir na ativação de linfócitos T por APCs (veja o painel A), tem, no máximo, um pequeno efeito em potencializar o crescimento desses tumores (*linha azul vs. linha vermelha*). Entretanto, quando camundongos com tumores são expostos ao anticorpo CTLA-4 nos tempos indicados (*setas*), a inativação da função dos linfócitos T que ocorre normalmente é aparentemente prevenida, e os linfócitos T hiperativados resultantes iniciam a eliminação das células tumorais (*linha verde*). Isso sugere uma estratégia para a imunoterapia do câncer, na qual a função CTLA-4 é suprimida por meio do uso de um anticorpo anti-CTLA-4. (E) Ocasionalmente, o uso clínico de um anticorpo monoclonal anti-CTLA-4, chamado MDX-010, produz respostas dramáticas, como esta observada em um paciente com melanoma metastático, cuja massa pulmonar principal e a efusão pleural (*painel à esquerda*) desapareceram de forma acentuada cinco meses depois do início da imunoterapia (*painel à direita*), como revelado por esta tomografia computadorizada (CT) de raios X. Este paciente foi primeiramente exposto a injeções repetidas de células dendríticas, cujos receptores MHC de classe II foram ligados *ex vivo* com um oligopeptídeo antigênico derivado do antígeno de melanomas MART-1 (veja a Figura 15.26); esse tratamento foi seguido, posteriormente, por uma injeção de anticorpo anti-CTLA-4. Respostas dramáticas como essa indicam o potencial desse tipo de imunoterapia, o qual ainda não foi percebido porque apresenta sucesso, nesse nível, em apenas uma pequena proporção de pacientes tratados. (A e B, extraídas de C.A. Janeway Jr. et al., *Immunobiology*, 6th Ed., New York: Garland Science, 2005; C, cortesia de J.P. Allison; D, extraída de D.R. Leach, M.F. Krumel e J.P. Allison, *Science* 271:1734-1736, 1996; E, cortesia de A. Ribas, J.A. Glaspy, Y. Lee et al., *J. Immunother.* 27:354-367, 2004.)

por células apresentadoras de antígeno. No contexto do câncer, o tratamento de camundongos implantados com tumores com um anticorpo monoclonal anti-CTLA-4 resultou em uma forte estimulação da resposta imune contra tumores, levando, em alguns casos, à regressão de tumores, sob circunstâncias nas quais eles continuariam a progredir (Figura 15.43D). Como efeito colateral, os anticorpos anti-CTLA-4 induzem ou exacerbam reações auto-imunes tanto em camundongos quanto em humanos, um forte indicativo de que esse sistema de sinalização em particular é um dos mecanismos primários usados pelo sistema imune para prevenir a destruição inadvertida de tecidos normais.

Os ensaios clínicos iniciais em humanos portadores de melanomas ou câncer de ovário em estágio avançado indicam que a eficácia de vários tipos de imunoterapias antitumorais pode ser marcadamente aumentada pela injeção de um anticorpo monoclonal anti-CTLA-4 denominado MDX-10, sem que ocorram reações auto-imunes sérias (Figura 15.43E). Em algumas ocasiões, esse anticorpo anti-CTLA-4 foi administrado a pacientes que ainda não haviam sido submetidos à imunoterapia. Em outros casos, a resposta imune antitumoral dos pacientes foi estimulada por meio de (1) vacinação com antígenos associados a melanoma purificados, como aqueles mencionados anteriormente, ou, (2) pela injeção com células tumorais *autólogas* (i. e., suas próprias células) que tenham sido induzidas *ex vivo* a expressarem GM-CSF e que foram posteriormente irradiadas (para prevenir a proliferação dessas células depois que elas fossem injetadas de volta nos pacientes). Como mencionado antes, essa expressão de GM-CSF serve para atrair células dendríticas. Esses pacientes foram então tratados com anticorpos anti-CTLA-4.

A segunda estratégia funcionou melhor: a imunização com células tumorais autólogas expressando GM-CSF seguida, algumas vezes, meses depois, pela injeção de anticorpo anti-

CTLA-4. Em um ensaio inicial, cinco entre cinco pacientes tiveram respostas claras a esse protocolo de tratamento em particular, com seus tumores apresentando áreas de necrose e de destruição intensa da vasculatura associada ao tumor.

Alguns pacientes com câncer foram tratados com interferons. Os três interferons (IFNs) – IFN- α , β e γ – podem induzir a expressão de moléculas MHC de classe I sobre as superfícies de muitos tipos celulares, incluindo células tumorais. Além disso, como descrito anteriormente, o IFN- γ pode também induzir a expressão de moléculas MHC de classe II por células apresentadoras de antígeno profissionais, podendo mobilizar vários tipos de células imunes, notavelmente macrófagos, células T citotóxicas e células matadoras naturais. Assim, os interferons podem prevenir a tendência das células tumorais de suprimir sua expressão de moléculas MHC de classe I, a fim de escapar da imunovigilância.

Na realidade, um número de pacientes com neoplasias hematopoiéticas, incluindo mielomas, linfomas e leucemias, têm apresentado uma regressão completa ou parcial de seus tumores em resposta a vários tratamentos com interferons. Similarmente, alguns melanomas, sarcomas de Kaposi e carcinomas renais e de mama têm mostrado esse tipo de resposta.

A capacidade da interleucina-2 (IL-2) de ativar linfócitos tem sido explorada pela adição dessa citocina (também chamada de **linfocina**) a misturas de células tumorais e linfócitos *in vitro*. Isso resulta na ativação funcional de linfócitos e em um aumento da morte de células tumorais em camundongos portadores de tumor. Essas células *matadoras ativadas por linfocinas* (LAK) são representadas quase que totalmente por células matadoras naturais, as quais, como já descrito, são especializadas em eliminar células-alvo que não apresentam quantidades normais de moléculas MHC de classe I e que expressam certas proteínas associadas à transformação ou ao estresse em sua superfície (veja as Figuras 15.29 e 15.30). Em alguns ensaios clínicos, as células LAK resultantes foram injetadas em pacientes em conjunto com IL-2, e, em um ensaio clínico, 16 de 222 pacientes tiveram uma regressão completa de seus tumores. Entretanto, os efeitos colaterais indesejáveis da IL-2 impediram o desenvolvimento desse tratamento como uma estratégia que pudesse ser utilizada rotineiramente na clínica oncológica.

Uma estratégia semelhante envolve a preparação de linfócitos que já estiveram presentes no tumor do paciente, manipulando essas células *ex vivo* e reintroduzindo-as no paciente – o procedimento de transferência adotiva de células (ACT). Novamente, as populações predominantes de linfócitos infiltrantes de tumores (TILs; veja a Figura 15.21) que são preparadas de amostras de tumores obtidas cirurgicamente são representadas por células matadoras naturais. Entretanto, uma subpopulação funcionalmente crítica das células nessas preparações TIL consiste em linfócitos T citotóxicos que adquiriram reatividade específica contra os antígenos apresentados por tumores a partir dos quais eles foram isolados. De forma importante, quando esses linfócitos T citotóxicos “treinados” são ativados funcionalmente *ex vivo*, adquirem apenas um centésimo da concentração de IL-2 necessária para ativar populações maiores de células matadoras naturais. A injeção dessas CTLs infiltrantes de tumores em pacientes (depois do aumento do seu número após a propagação estendida *in vitro*) causou a regressão parcial de tumores em cerca de um quarto dos pacientes com melanoma ou carcinoma renal que foram tratados. Até o momento, tentativas de gerar TILs com atividade antitumoral citotóxica específica contra outros tipos de tumor não apresentaram sucesso.

As respostas ao tratamento com TIL descritas anteriormente têm sido de curta duração, o que pode ser explicado, em parte, pela incapacidade das populações de TILs introduzidas de se estabelecerem no organismo dos pacientes de câncer sob tratamento. Essa observação conduziu a tentativas para estabilizar e expandir as populações de linfócitos antitumorais *in vivo*, tratando os pacientes com melanoma com quimioterapia, antes da injeção de TILs expandidos *ex vivo* (Figura 15.44A). Nesse caso, a razão para o tratamento quimioterápico não seria matar as células tumorais. Em vez disso, o tratamento é empregado a fim de reduzir as populações de linfócitos e de precursores de linfócitos da medula óssea dos pacientes, preparando espaço para os clones das TILs a serem introduzidos posteriormente. Essas células podem

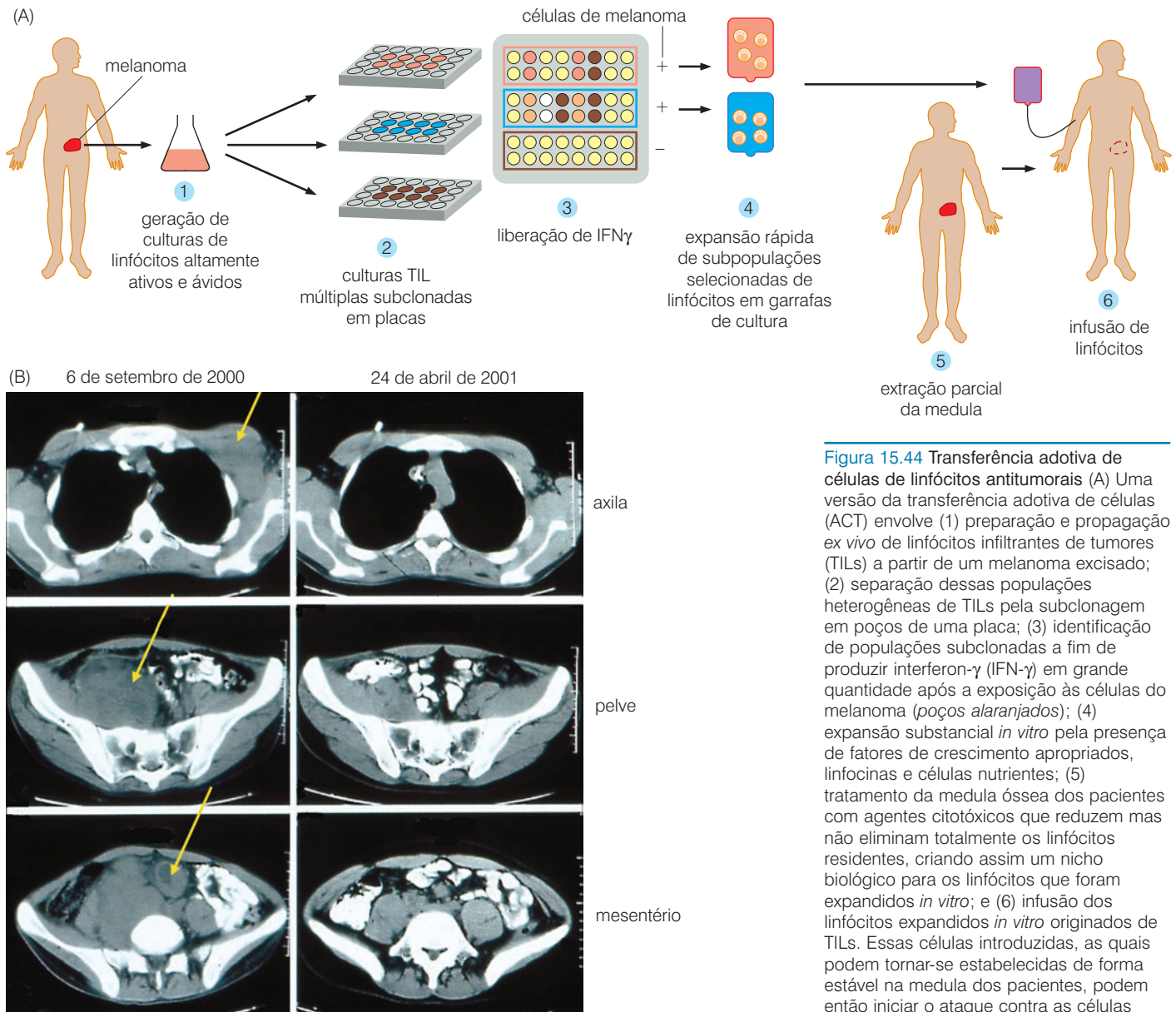


Figura 15.44 Transferência adotiva de células de linfócitos antitumorais (A) Uma versão da transferência adotiva de células (ACT) envolve (1) preparação e propagação *ex vivo* de linfócitos infiltrantes de tumores (TILs) a partir de um melanoma excisado; (2) separação dessas populações heterogêneas de TILs pela subclonagem em poços de uma placa; (3) identificação de populações subclonadas a fim de produzir interferon- γ (IFN- γ) em grande quantidade após a exposição às células do melanoma (*poços alaranjados*); (4) expansão substancial *in vitro* pela presença de fatores de crescimento apropriados, linfocinas e células nutrientes; (5) tratamento da medula óssea dos pacientes com agentes citotóxicos que reduzem mas não eliminam totalmente os linfócitos residentes, criando assim um nicho biológico para os linfócitos que foram expandidos *in vitro*; e (6) infusão dos linfócitos expandidos *in vitro* originados de TILs. Essas células introduzidas, as quais podem tornar-se estabelecidas de forma estável na medula dos pacientes, podem então iniciar o ataque contra as células tumorais. (B) O uso de ACT produz ocasionalmente respostas dramáticas como aquela observada neste paciente que foi tratado de um melanoma metastático.

então se estabelecer na medula dos pacientes, persistindo e expandindo durante o curso da imunoterapia. Em alguns pacientes, as populações clonais de CTLs antitumorais injetadas formam a população predominante dentre todas as células T citotóxicas dos seus sistemas imunes. Essas células T citotóxicas, cujo crescimento *in vivo* foi sustentado pela administração de interleucina-2 (IL-2) a esses pacientes, mostraram uma maior potência na eliminação de células de melanoma. Em vários desses pacientes, foram observadas regressões dramáticas dos melanomas (Figura 15.44B).

Tais respostas, apesar de convincentes, são apenas iniciais, e nenhum desses protocolos de imunoterapia alcançou um estágio em que se observassem respostas terapêuticas com proporções substanciais. Torna-se evidente que esse é apenas o início do conhecimento sobre como manipular o sistema imune de pacientes com câncer de forma a produzir a regressão tumoral. Isso explica por que os protocolos descritos aqui são apenas passos incipientes e que, provavelmente, em breve, serão superados por estratégias mais efetivas de potencialização das respostas imunes contra tumores.

As metástases do paciente (*setas amarelas*) em uma axila (embaixo do braço, *acima*), na região pélvica (*meio*) e nos linfonodos mesentéricos (associados ao intestino; *abaixo*), como analisado por tomografia computadorizada (CT) de raios X em 06 de setembro de 2000 (*painéis à esquerda*), haviam reduzido marcadamente em 24 de abril de 2001 (*painéis à direita*). Essas respostas, embora não sejam típicas, sugerem que os sistemas imunes dos pacientes com câncer podem um dia ser manipulados para gerar resultados como esses de forma reprodutível. (A, extraída de M.E. Dudley e S.A. Rosenberg, *Nat. Rev. Cancer* 3:666-675, 2003; B, extraída de S.A. Rosenberg e M.E. Dudley. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:14639-14645, 2004.)

15.23 Sinopse e perspectivas

As interações entre o sistema imune e o câncer são certamente muito complexas, e o papel preciso que as células imunes exercem sobre a supressão da maior parte dos tumores humanos ainda não é totalmente compreendido. Estudos com pacientes imunocomprometidos fornecem evidências claras de que a imunovigilância é responsável por auxiliar na prevenção do aparecimento de uma variedade de tumores induzidos por vírus. As respostas imunes humorais são relacionadas com a supressão da disseminação de infecções virais nos tecidos, minimizando, assim, o número de células infectadas por vírus, algumas das quais poderiam finalmente progredir para um estágio tumorogênico.

Ainda mais importante, a expressão continuada de proteínas virais por células tumorais transformadas por vírus origina antígenos claramente reconhecidos como estranhos, que podem ativar uma resposta imune muito efetiva, especialmente mediada pelo componente celular da imunidade. Os oligopeptídeos virais antigênicos, quando apresentados a proteínas MHC de classe I das células tumorais, atraem a atenção de células T citotóxicas, as quais iniciam o processo de eliminação das células infectadas ou transformadas por vírus.

A contribuição da resposta imune na proteção contra muitos tipos de câncer de origem *não-viral* ainda é uma questão ambígua. É difícil prever a extensão na qual a imunovigilância exerce um papel na eliminação ou no retardo da formação desses tumores. Parte do que se conhece acerca da importância desses mecanismos tem como base o estudo de pacientes imunocomprometidos, nos quais as taxas de certos tumores sólidos de origem não-viral são 2 a 3 vezes mais elevadas do que na população geral.

Algumas células tumorais podem ser capazes de escapar da eliminação pelo sistema imune porque apresentam alguns poucos antígenos que são de fato estranhos e, assim, beneficiam-se da tolerância que o sistema imune normal desenvolve contra proteínas “próprias”. Ademais, outras células tumorais podem expressar proteínas e antígenos potenciais em quantidades ou em sítios anormais; essa expressão ectópica pode alertar o sistema de imunovigilância, o qual iniciará a identificação e a eliminação das células tumorais relacionadas.

Uma vez sob ofensiva, as células tumorais freqüentemente se defendem com algumas manobras de contra-ataque. Elas podem reduzir a expressão dos antígenos que inicialmente desencadearam a ativação do sistema imune, freqüentemente usando a mesma estratégia – a metilação dos promotores – que é também utilizada para protegê-las da atividade de genes de supressão de tumores. De maneira alternativa, elas podem suprimir a expressão de moléculas MHC de classe I, que permitem ao sistema imune detectar a presença de antígenos sobre sua superfície. O fato de que as moléculas MHC de classe I com freqüência são ausentes em células metastáticas reforça a noção de que a migração de células tumorais através dos tecidos do organismo e da circulação representa um passo arriscado que é geralmente impedido por células imunes que se encontram ao longo desses sítios.

Se todas essas manobras imunoevasivas não forem suficientes, as células tumorais podem instalar um sistema de defesa ainda mais efetivo por afastar ou eliminar possíveis agentes de ataque. Por exemplo, a liberação de agentes antiapoptóticos potentes, como o TGF- β e o FasL, podem normalmente assegurar a eliminação de quaisquer imunócitos que porventura estejam próximos das células neoplásicas.

Finalmente, a defesa mais efetiva ativada pelas células tumorais pode ser derivada dos principais sistemas celulares do organismo associados ao estabelecimento e manutenção da tolerância imunológica – os mecanismos que comumente previnem o desenvolvimento de ataques auto-imunes sobre os próprios tecidos do corpo. A tolerância em relação a vários antígenos parece depender das ações de células T regulatórias (T_{reg} s), as quais funcionam para garantir que ambos os componentes, humoral e celular, da resposta imune não destruam os tecidos normais. A capacidade de tumores humanos de liberar o fator quimiotático CCL22 (o qual serve para atrair T_{reg} s) pode beneficiar as células tumorais, mais do que qualquer outro mecanismo de evasão citado anteriormente.

Quando avaliadas em conjunto, essas várias e bem-conhecidas manobras pelas quais as células tumorais escapam do ataque do sistema imune nos fazem acreditar que esse seria um importante fator para a progressão da maior parte, senão de todos os tipos de tumores altamente malignos. Além disso, a imunoevasão pode ser reconhecida como uma característica da neoplasia tão fundamental como as que foram enumeradas anteriormente (Seção 11.18).

Previamente, cada uma das etapas de progressão tumoral foi ilustrada como a capacidade de violar um dos importantes mecanismos de defesa anticâncer das células e dos tecidos (Capítulo 11). Se isso é verdade, a contribuição relativa desses vários mecanismos de defesa na prevenção do início do câncer seria questionável. A maior parte desses mecanismos representa as ações de um circuito regulatório que é altamente controlado em todas as nossas células. Até que ponto as defesas anticâncer podem ser atribuídas a esses mecanismos autônomos das células, ou seja, processos que ocorrem em células individuais em transformação neoplásica? Além disso, em que extensão as defesas contra o câncer são originadas de ações do organismo como um todo ou das ações do sistema imune? Respostas definitivas para essas questões ainda são inexistentes, e mais uma década poderia se passar antes que fossem obtidas.

As falhas freqüentes do sistema imune normal em iniciar defesas efetivas contra a maioria dos tumores não impedem o desenvolvimento eventual de estratégias imunoterapêuticas verdadeiramente efetivas contra o câncer. Pelo conhecimento de como os vários componentes do sistema imune são regulados, os imunologistas estão avançando na capacidade de manipular e reforçar esses componentes de ataque a células tumorais. Apenas algumas das muitas estratégias de mobilização do sistema imune que estão sendo investigadas (Tabela 15.4 e Figura 15.45) foram descritas neste capítulo.

Até o presente, mas de 100 citocinas (fatores regulatórios do sistema imune que incluem interleucinas e interferons) e seus receptores cognatos foram identificados. Algumas delas já foram caracterizadas funcionalmente, enquanto a maior parte ainda não. Elas podem ser genericamente divididas em fatores que potencializam a função imune (p. ex., interferons, interleucina-2) e aquelas que inibem (p. ex., IL-10, TGF- β). Essa grande lista de citocinas é um indicativo da complexidade da regulação imune. Na realidade, apenas começamos a compreender a fisiologia do sistema imune normal e as possibilidades de manipulá-lo a fim de reforçar as defesas anticâncer. O fato de que um tipo fundamentalmente importante de imunócito – a célula T regulatória (T_{reg}) – foi apenas recentemente estudado indica que o campo da imunologia continua a rever muitos dos seus conceitos fundamentais.

Tabela 15.4 Exemplos de estratégias de imunoterapia antitumoral

Imunização passiva
Infusão de anticorpos monoclonais tumor-específicos (p. ex., Herceptina, Rituxan)
Medula enxertada histo-incompatível
Imunização ativa
Infusão de linfócitos infiltrantes de tumor (TILs)
Infusão de células dendríticas carregadas com oligopeptídeos tumor-específicos
Adição do receptor de co-ativação B7 ao antígeno específico de tumor introduzido
Bloqueio da função CTLA-4
Inibição de células T regulatórias

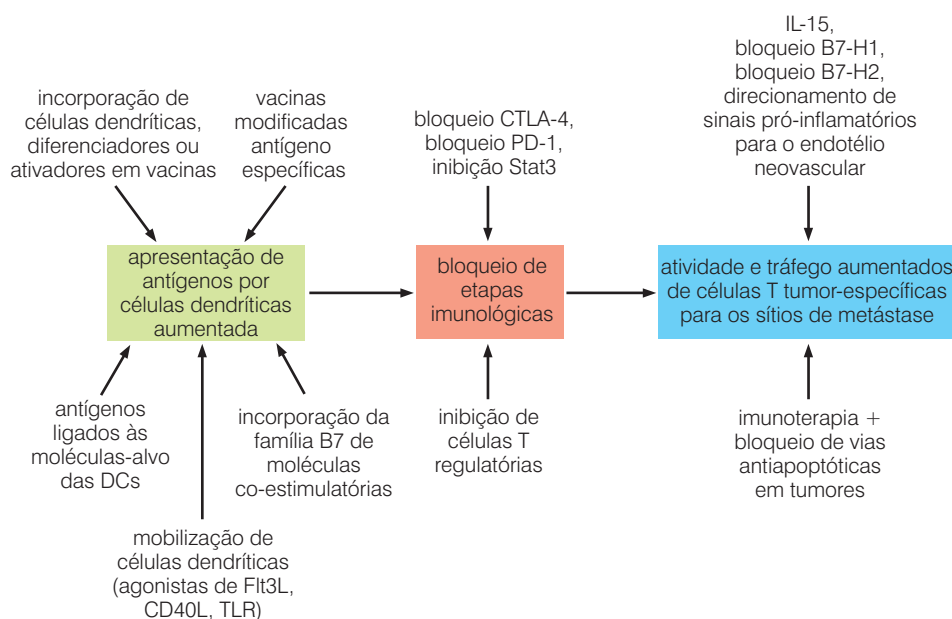


Figura 15.45 Estratégias para a imunoterapia anticâncer Várias estratégias distintas são atualmente empregadas a fim de criar mais imunoterapias anticâncer efetivas. Como indicado aqui, essas são baseadas em três etapas principais da função imunológica: aumentando da apresentação de antígenos, suprimindo os pontos de controle imunológico e aumentando a migração de células T para as massas tumorais. Muitas das estratégias indicadas nesta figura não foram discutidas neste capítulo. B7-H1 e B7-H4 = proteínas B7 relacionadas. DC = células dendríticas; Flt3L = ligante do receptor de citocina do tipo-Fms; PD-1 = proteína relacionada a CTLA-4; TLR = receptor *Toll-like*. (Extraída de D. Pardoll e J. Allison, *Nat. Med.* 10:887-892, 2004.)

Ainda não está claro como e quando, precisamente, durante a progressão tumoral, o sistema imune é primeiro alertado acerca da presença de células tumorais, dando início a várias tentativas, freqüentemente sem sucesso, de eliminá-las. Isso poderia ocorrer quando as células de carcinoma invadem o estroma e encontram os imunócitos diretamente. Um modelo alternativo interessante, ainda não comprovado, localiza esse encontro entre células tumorais e imunes ainda nas fases inflamatórias da progressão tumoral, quando os macrófagos e outros leucócitos são inicialmente recrutados para o estroma do tumor.

No momento, é impossível dizer quais dentre as várias estratégias de imunoterapia que se encontram em desenvolvimento representarão precursores de tratamentos anticâncer que se mostrem mais efetivos do que as terapias já disponíveis, promovendo curas consistentes e de longa duração para a maior parte dos pacientes sob tratamento. De uma forma menos otimista, o desenvolvimento de imunoterapias verdadeiramente curativas poderia sempre ser frustrado pela inventividade e plasticidade das células tumorais. Talvez os aspectos fundamentais das doenças neoplásicas apresentem obstáculos à imunoterapia do câncer que nunca venham a ser contornados pelo conhecimento dos imunologistas ou daqueles que pesquisam a biologia do câncer. Essas questões serão novamente discutidas no próximo capítulo, no qual as descobertas biológicas descritas ao longo deste livro são aplicadas ao desenvolvimento de novas drogas de baixo peso molecular desenhadas para combater o perfil evasivo e mutacional das células tumorais.

Conceitos-chave

- O sistema imune ativa duas formas de defesa contra agentes infecciosos ou células que devem ser eliminadas ou neutralizadas; essas envolvem a imunidade celular e a imunidade humoral.
- Algumas células do sistema imune têm a habilidade inata de reconhecer células que devem ser eliminadas; macrófagos e células matadoras naturais são os dois principais representantes dessa classe.
- Os linfócitos T desenvolvem a capacidade de reconhecer alvos antigênicos por meio da expressão de receptores de células T, os quais são elementos-chave da imunidade adaptativa e são criados pelo rearranjo de segmentos de genes semelhantes àqueles que levam à formação de anticorpos solúveis. Esses linfócitos são principalmente células T citotóxicas (CTLs, ou T_C 's), células T auxiliares e células T regulatórias (T_{reg} 's).
- Células T auxiliares auxiliam células B no desenvolvimento de anticorpos, ativando, assim, a imunidade humoral e ajudando as células T citotóxicas a se desenvolver e reconhecer células que devam ser eliminadas. As células T regulatórias suprimem as ações das células T auxiliares e citotóxicas.
- Células normais do organismo rotineiramente apresentam fragmentos oligopeptídicos de suas proteínas sobre a superfície celular, utilizando moléculas MHC de classe I para tal. Células apresentadoras de antígeno profissionais, como macrófagos e células dendríticas, usam moléculas MHC de classe II para apresentar fragmentos oligopeptídicos de proteínas que foram seqüestradas do ambiente tecidual. Esses vários fragmentos oligopeptídicos representam os antígenos que são reconhecidos pelos receptores de células de linfócitos T auxiliares e citotóxicos.
- Anticorpos que reconhecem antígenos sobre a superfície de uma célula podem direcionar a eliminação celular por meio de dois mecanismos distintos: (1) células que expressam receptores Fc, especificamente macrófagos e matadoras naturais, podem se ligar a células marcadas com anticorpos, eliminando-as; (2) o complemento pode se acoplar ao anticorpo de superfície, matando a célula pela formação de poros na membrana plasmática.
- O sistema imune tem a capacidade intrínseca de desenvolver o reconhecimento imune de ambos, antígenos de tecidos normais e aqueles expressos por elementos estranhos, especificamente, agentes infecciosos. Entretanto, o sistema imune emprega vários mecanismos distintos para suprimir a reatividade de seus vários componentes contra os antígenos teciduais normais, desenvolvendo, assim, tolerância a estes.

- Muitas das ações do sistema imune direcionadas ao reconhecimento e eliminação de agentes infecciosos podem também ser usadas para o ataque de células tumorais. Entretanto, os mecanismos de indução de tolerância complicam essas respostas, já que a maior parte dos antígenos de células tumorais é componente de proteínas celulares normais.
- Alguns antígenos associados a tumores podem ainda atrair a atenção do sistema imune, pois são normalmente expressos apenas em embriões ou em sítios imunologicamente privilegiados, como testículos e cérebro, nos quais o desenvolvimento de tolerância não acontece. Outros antígenos associados a tumores podem evocar o reconhecimento imune e o ataque porque são expressos em níveis elevados.
- O fato de que indivíduos imunocomprometidos apresentam níveis mais elevados de vários tipos de câncer sugere fortemente que o sistema imune está continuamente monitorando os tecidos do corpo para avaliar a presença de tumores e tentar eliminá-los – o processo de imunovigilância.
- Alguns tipos de câncer podem progredir no organismo, apesar da imunovigilância, simplesmente porque, por alguma razão, são fracamente antigênicos. Outros podem ter sido fortemente antigênicos originalmente, tendo gerado variantes fracamente antigênicas. Essa representa uma das muitas estratégias imunoevasivas usadas pelos tumores.
- Antígenos associados a tumores (TAAs) são expressos por células tumorais e frequentemente refletem programas de diferenciação dos tecidos nos quais esses tumores surgiram. A supressão da expressão de TAA pode permitir que as células tumorais escapem da imunovigilância e, ao mesmo tempo, pode ocorrer sem que haja o comprometimento da capacidade dessas células de proliferar.
- Outra estratégia imunoevasiva envolve a liberação de fatores, como IL-10, FasL e TGF- β , que são capazes de eliminar células imunes que se aproximem demais das células tumorais.
- As células tumorais podem também atrair células T regulatórias, as quais podem inativar qualquer célula T citotóxica que tenha alcançado a massa tumoral.
- Uma vez que o sistema imune frequentemente falha em bloquear o desenvolvimento de tumores, os pesquisadores desenvolveram uma série de estratégias terapêuticas que suplementam ou reforçam a resposta imune existente. Uma estratégia importante é tratar os pacientes com anticorpos monoclonais (MoAbs) que podem se ligar a suas células tumorais, levando à morte dessas células por uma variedade de mecanismos. Dentre esses MoAbs estão a Herceptina e o Rituxan.
- Alternativamente, algumas tentativas de desenvolvimento de protocolos imunoterapêuticos anticâncer envolvem a alteração de agentes de sinalização que normalmente regulam as atividades de vários tipos de células imunes. Por exemplo, o GM-CSF pode ser usado para ativar células dendríticas, enquanto o anticorpo anti-CTLA-4 pode ser usado para aumentar as interações entre as células apresentadoras de antígeno e as células T auxiliares.
- As respostas do sistema imune a tumores ainda são mal compreendidas, e a multiplicidade dos reguladores imunes cria a oportunidade de ativar respostas antitumorais de muitas formas, sendo que a maior parte delas ainda não foi testada na clínica oncológica.

Questões elaboradas

1. Como os genes virais nos ajudam a compreender como as células tumorais escapam da imunovigilância?
2. De que forma poderia ser possível fazer com que células tumorais se tornassem mais imunogênicas?
3. Como a medida das funções imunes poderia fornecer uma idéia acerca da presença de tumores no organismo?
4. Como seria possível determinar se os macrófagos associados a tumores (TAMs) estão trabalhando para suportar o crescimento tumoral ou como agentes do sistema imune na eliminação tumoral?
5. Por que meios distintos as oncoproteínas poderiam tornar as células tumorais mais resistentes à eliminação pelos vários componentes do sistema imune?
6. Qual você acredita que seria a evidência mais convincente de que o sistema imune exerce um papel significativo na supressão do aparecimento dos tumores sólidos mais comuns?
7. Como você avaliaria a importância relativa da imunidade inata *versus* a imunidade adaptativa na supressão do aparecimento de tumores clinicamente aparentes?

Leitura adicional

- Alegre M-L, Frauwirth KA & Thompson CB (2001) T-cell regulation by CD28 and CTLA-4. *Nat. Rev. Immunol.* 1, 220–228.
- Bingle L, Brown NJ & Lewis CE (2002) The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. *J. Pathol.* 196, 254–265.
- Boye J, Elter T & Engert A (2003) An overview of the current clinical use of the anti-CD20 monoclonal antibody rituximab. *Ann. Oncol.* 14, 520–535.
- Cheson BD (2002) Rituximab: clinical development and future directions. *Expert Opin. Biol. Ther.* 2, 97–110.
- Darnell R (2004) Tumor immunity in small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.* 22, 762–764.
- Dillman RO (2001) Monoclonal antibody therapy for lymphoma: an update. *Cancer Pract.* 9, 71–80.
- Dranoff G (2002) Tumour immunology: immune recognition and tumor protection. *Curr Opin. Immunol.* 14, 161–164.
- Dranoff G (2004) Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* 4, 11–22.
- Dudley ME & Rosenberg SA (2003) Adoptive-cell-transfer therapy for the treatment of patients with cancer. *Nat. Rev. Cancer* 3, 666–675.
- Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H et al. (2002) Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat. Immunol.* 3, 991–998.
- Dunn GP, Old LJ & Schreiber RD (2004) The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity* 21, 1–20.
- Figdor CG, de Vries IJ, Lesterhuis WJ & Melief CJ (2004) Dendritic cell immunotherapy: mapping the way. *Nat. Med.* 10, 475–480.
- Finn OJ (2003) Cancer vaccines: between the idea and reality. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 630–641.
- Fishelson Z, Donin N, Zell S et al. (2003) Obstacles to cancer immunotherapy: expression of membrane complement regulatory proteins (mCRPs) in tumors. *Mol. Immunol.* 40, 109–123.
- Gelderman KA, Tomlinson S, Ross GD & Gorter A (2004) Complement function in mAb-mediated cancer immunotherapy. *Trends Immunol.* 24, 158–164.
- Greenwald RJ, Freeman GJ & Sharpe AH (2005) The B7 family revisited. *Annu. Rev. immunol.* 23, 515–548.
- Harris M (2004) Monoclonal antibodies as therapeutic agents for cancer. *Lancet Oncol.* 5, 292–302.
- Houghton AN, Gold JS & Blachere NE (2001) Immunity against cancer: lessons learned from melanoma. *Curr. Opin. Immunol.* 13, 134–140.
- Khong HT & Restifo NP (2002) Natural selection of tumor variants in the generation of “tumor escape” phenotypes. *Nat. Immunol.* 3, 999–1005.
- Korman A, Yellin M & Keler T (2005) Tumor immunotherapy: preclinical and clinical activity of anti-CTLA4 antibodies. *Curr Opin. Invest. Drugs* 6, 582–591.
- Lieberman FS & Schold SC (2002) Distant effects of cancer on the nervous system. *Oncology* 16, 1539–1551.
- Melief CJM, Van Der Burg Sh, Toes RE et al. (2002) Effective therapeutic anticancer vaccines based on precision guiding of cytolytic T lymphocytes. *Immunol. Rev.* 188, 177–182.
- Old LJ (2001) Cancer/testis (CT) antigens—a new link between gametogenesis and cancer. *Cancer Immun.* 1, 1.
- Old L & Chen Y-T (1998) New paths in human cancer serology. *J. Exp. Med.* 187, 1163–1167.
- Pardoll DM (2002) Spinning molecular immunology into successful immunotherapy. *Nat. Rev. immunol.* 2, 227–238.
- Pardoll D (2003) Does the immune system see tumors as foreign or self? *Annu. Rev. Immunol.* 21, 807–839.
- Pardoll D & Allison J (2004) Cancer immunotherapy: breaking the barriers to harvest the crop. *Nat. Med.* 10, 887–892.
- Penn I (1994) Depressed immunity and the development of cancer. *Cancer Detect. Prevent.* 18, 241–252.
- Rathmell JC & Thompson CB (1999) The central effectors of cell death in the immune system. *Annu. Rev. Immunol.* 17, 781–828.
- Raulet D (2003) Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 781–790.
- Riddell SR (2001) Progress in cancer vaccines by enhanced self-presentation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 8933–8935.
- Sakaguchi S (2005) Naturally arising Foxp3-expressing CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat. Immunol.* 6, 345–352.
- Scanlan MJ, Gure AO, Jungbluth AA et al. (2002) Cancer/testis antigens: an expanding family of targets for cancer immunotherapy. *Immunol. Rev.* 188, 22–32.
- Schwartz RH (2005) Natural regulatory T cells and self-tolerance. *Nat. Immunol.* 6, 327–330.
- Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S et al. (2001) Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancers that overexpress HER2. *N. Engl. J. Med.* 344, 783–792.
- Smith MR (2003) Rituximab (monoclonal anti-CD20 antibody): mechanisms of action and resistance. *Oncogene*, 22, 7359–7368.
- Smyth MJ, Godfrey DI & Trapani JA (2001) A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy. *Nat. Immunol.* 2, 293–299.
- Smyth MJ, Hayakawa Y, Takeda K & Yagita H (2002) New aspects of natural-killer cell surveillance and therapy of cancer. *Nat. Rev. Cancer* 2, 850–861.
- Turk MJ, Wolchok JD, Guevara-Patino JA et al. (2002) Multiple pathways to tumor immunity and concomitant autoimmunity. *Immunol. Rev.* 188, 122–135.
- Wang E, Paneti MC & Marincola FM (2005) Gene profiling of immune responses against tumors. *Curr Opin. Immunol.* 17, 423–427.



CAPÍTULO 16

Tratamento Racional do Câncer

“Todas as substâncias são venenosas, não existe nenhuma que não seja um veneno; a dose correta diferencia um veneno de um remédio.”

Paracelsus (Auroleus Phillipus Theoprastus Bombastus von Hohenheim), alquimista e médico, 1538

“Médicos são homens que prescrevem medicamentos dos quais eles sabem pouco para curar doenças das quais eles sabem menos em seres humanos de quem eles não sabem nada.”

Voltaire (François-Marie Arounet), filósofo, 1760

A pesquisa descrita neste livro representa a revolução na nossa compreensão sobre a patogênese do câncer. Em 1975, praticamente não havia conhecimentos sobre as alterações moleculares dentro das células humanas que levam ao aparecimento de malignidades. Em uma geração posterior, temos esse conhecimento em abundância. Na verdade, pode-se dizer que certamente as informações disponíveis e os conceitos sobre as origens do câncer constituem uma ciência com estrutura conceitual lógica e coerente.

Apesar desses saltos extraordinários para a frente, um progresso relativamente pequeno foi feito na exploração desses conhecimentos sobre a etiologia (i. e., os mecanismos causadores da doença) para prevenir a doença e, igualmente importante, para tratá-la. A maioria dos tratamentos anticâncer em amplo uso atualmente foi desenvolvida antes de 1975, em um momento em que o desenvolvimento de terapêuticos ainda não era informado pelos mecanismos genéticos e bioquímicos da patogênese do câncer. Isso explica a ampla frustração sentida pelos oncologistas moleculares de que o potencial da sua pesquisa para contribuir para novas terapias anticâncer não tinha sido compreendido.

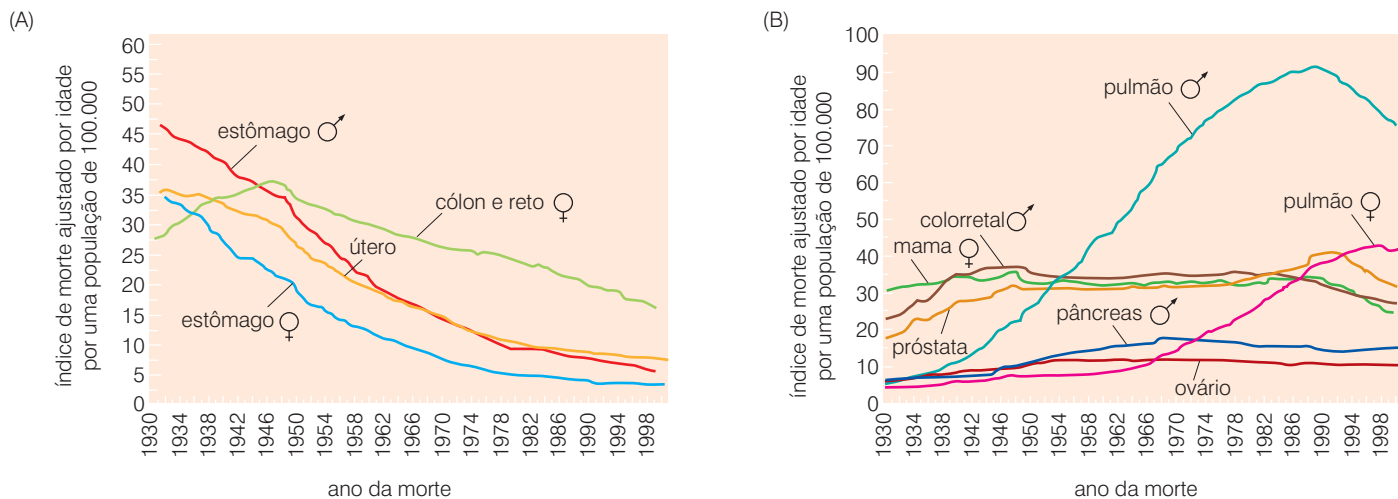


Figura 16.1 Estatísticas de mortalidade por câncer durante os três quartos de século passados: o estado das coisas As estatísticas compiladas nos Estados Unidos sobre os índices de morte ajustados por idade de vários tipos de câncer revelam duas tendências diferentes em longo prazo. (A) A mortalidade pelos principais matadores diminuiu significativamente desde 1930. Isso ocorreu devido a alterações nas práticas de estocagem de alimentos e possivelmente nos índices de infecção por *Helicobacter pylori*, no caso de câncer de estômago, e a triagem, nos casos de câncer cervical e colorretal. (B) Várias das principais origens de morte relacionadas ao câncer se mostraram resistentes à maioria das formas de terapia tradicional, especialmente quando esses tumores progridem para um estágio metastático altamente maligno. (A partir de A. Jemal, T. Murray, E. Ward et al., *CA Câncer J. Clin.* 55:10-30, 2005.)

Essa frustração foi mais fortemente alimentada pela lentidão dos avanços no tratamento de tumores sólidos comuns. Por exemplo, em 1970, nos Estados Unidos, 7% dos pacientes diagnosticados com câncer de pulmão continuavam vivos cinco anos após o seu diagnóstico inicial. Três décadas depois, esse número subiu para apenas 14%, uma melhora relativamente pequena. E mesmo esse grau de sucesso terapêutico pode ser ilusório, uma vez que técnicas modernas de diagnóstico muitas vezes detectam tumores muito antes no seu curso clínico, criando um espaço de tempo maior entre o diagnóstico inicial e a progressão para a doença em fase terminal. Os índices de morte por câncer de cólon começaram a cair, pela detecção precoce e remoção cirúrgica dos tumores que avançaram apenas pelos estágios iniciais da progressão do tumor (Figura 16.1A; veja também a Figura 11.8C). Entretanto, a mortalidade causada pelos tumores colorretais mais avançados mudou pouco nas décadas recentes – um certificado para as falhas da quimioterapia e da radiação em eliminar essas malignidades uma vez que elas tenham invadido e começado a fazer metástases.

Sem dúvida, a atual abundante informação sobre os mecanismos moleculares e celulares da patogênese do câncer inspirará novos meios para tratar efetivamente a doença. Neste capítulo, exploraremos várias estratégias de terapias em desenvolvimento ou recentemente introduzidas na clínica. O objetivo não é investigar todo o âmbito de pesquisas em progresso nessas áreas. Isso seria inalcançável: uma compilação de 2003 de terapias anticâncer em desenvolvimento pré-clínico ou em testes clínicos listou mais de 1.300 projetos de pesquisa e de desenvolvimento que estavam sendo levadas adiante por várias companhias farmacêuticas grandes e firmas biotecnológicas menores. Os agentes terapêuticos em desenvolvimento incluem drogas de baixo peso molecular, proteínas, anticorpos monoclonais e estratégias de terapia gênica, incluindo vetores virais.

Em vez de sermos enciclopédicos, nos concentraremos em um pequeno número de terapias recentemente desenvolvidas que ilustrarão como as descobertas descritas nos capítulos anteriores inspiraram novas estratégias para tratar o câncer e como o diagnóstico molecular vai fazer, cada vez mais, parte do desenvolvimento e da introdução na clínica de novas terapias.

Ao mesmo tempo, discutiremos como a biologia molecular está mudando as estratégias de prevenção de câncer. Assim, não examinaremos os maiores avanços que foram realizados no desenvolvimento de vacinas que protegem contra infecções com o vírus da hepatite B (HBV) e do papilomavírus humano (HPV); essas vacinas deveriam ser muito eficientes na redução da incidência de hepatomas e carcinomas cervicais, que são descontrolados em certas partes do mundo. (Se a história passada de saúde pública for um guia, a prevenção do câncer irá

finalmente gerar reduções muito maiores na mortalidade relacionada à doença do que as terapias do tipo das discutidas neste capítulo.)

O presente capítulo concentra-se em terapêuticos de moléculas pequenas e nos seus alvos intracelulares que foram identificados pela pesquisa das vias de sinalização dentro das células cancerosas. Todas essas estratégias trouxeram grandes esperanças, e, invariavelmente, o seu verdadeiro potencial ainda está para ser compreendido. As histórias envolvendo o desenvolvimento de cada uma dessas drogas são interessantes e provocativas, pois elas ensinam lições importantes sobre os triunfos e ciladas no desenvolvimento de novos tratamentos anticâncer. Note que várias estratégias terapêuticas baseadas em anticorpos monoclonais já foram discutidas com alguns detalhes em capítulos anteriores, já que existem várias terapias focadas na prevenção ou bloqueio da angiogênese de tumores. Também note que os meios convencionais de tratar câncer, a maioria dos quais tem sido utilizada há décadas, não são discutidos aqui, pois o seu desenvolvimento não foi informado pelas descobertas mais recentes descritas neste livro.

Quase todos os achados de pesquisa descritos neste livro serão submetidos ao teste do tempo e serão considerados creditáveis e corretos (mesmo que possivelmente não tão interessantes) por uma geração desde agora. Entretanto, aqueles que amam a certeza e as verdades eternas acharão as histórias que seguem insatisfatórias por uma simples razão: o trabalho reportado está em grande fluxo e, assim, muito mais sensível ao tempo.

Várias destas terapias parecerão estranhas e antiquadas uma década depois que este capítulo foi escrito. A campanha para converter o entendimento sobre as causas moleculares do câncer em novas maneiras de curar a doença recém começaram. E assim nos deparamos com seus primeiros tropeços.

16.1 O desenvolvimento e o uso clínico de terapias efetivas dependerão do diagnóstico acurado da doença

Nos capítulos anteriores, repetidamente categorizamos os cânceres em termos de tecidos de origem e estágios de progressão clínica. Quase sempre essas tarefas foram ditadas pela aparência dos tecidos normais e malignos sob o microscópio. Em algumas ocasiões, para ter certeza, refinamos essas classificações pela descrição de certos marcadores moleculares (p. ex., expressão de HER2 em cânceres de mama) e as implicações que eles trazem para o prognóstico. Mas, em geral, a histopatologia foi suprema nas nossas discussões, como ela o fez na prática da clínica oncológica por mais da metade de um século.

Mesmo sem a percepção das origens moleculares dos cânceres humanos, se tornou cada vez mais claro que os meios tradicionais de classificar os cânceres têm utilidade limitada. O diagnóstico verdadeiramente útil deve informar ao clínico sobre a natureza nebulosa das doenças e, mais importante, como cada entidade de doença responderá a vários tipos de terapia. Como estudamos mais sobre cânceres humanos, percebemos que vários cânceres humanos que tradicionalmente foram agrupados como exemplos de uma entidade de doença única deveriam, de fato, ser separados em várias subcategorias distintas da doença. Isso ajuda a explicar porque várias terapias anticâncer existentes usadas durante as últimas três décadas têm tido tais baixos índices de sucesso. Esses índices de resposta também têm implicações importantes para o desenvolvimento de novas drogas.

Para pacientes que carregam o subtipo de um tumor que responde a um tratamento em particular, essa terapia pode ser considerada uma “bênção”, estendendo a vida e até oferecendo cura na ocasião. Para os pacientes restantes, uma terapia aplicada uniformemente não gera efeitos clínicos positivos e pode desviar esses pacientes de receber outros tratamentos que poderiam ser verdadeiramente eficientes. Possivelmente de forma mais grave, os tratamentos anticâncer muitas vezes causam vários efeitos colaterais e alguns podem realmente aumentar a incidência de cânceres secundários que surgem anos mais tarde. Por exemplo, no início dos

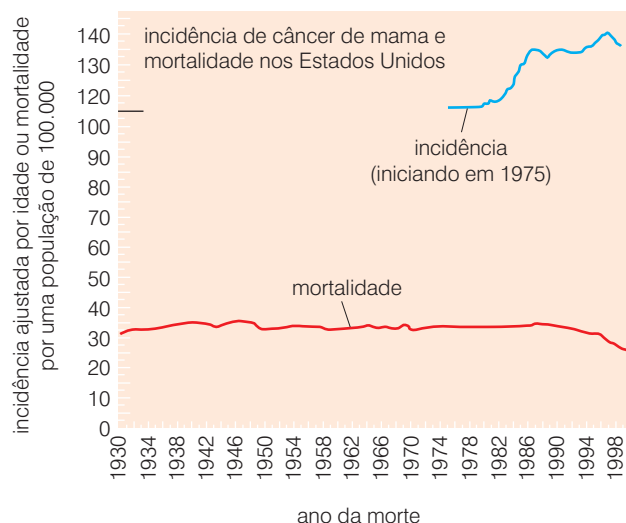
anos 1980, pacientes com câncer de mama recebendo a então dose-padrão de ciclofosfamida (uma droga quimioterapêutica que também é um agente alquilante) experimentaram um aumento de 5,7 vezes no risco de desenvolver subsequentemente uma leucemia mielogênica aguda (AML). (Protocolos atuais de tratamento usam uma dosagem diminuída da droga resultam em uma incidência muito diminuída do tal câncer secundário.) Tudo isso aponta para a grande necessidade de mais ferramentas de diagnóstico refinado – que possam prever exatamente a reação a várias terapias antitumor e evitar o uso de terapias quando elas não são necessárias.

Em 2003, cerca de 192 mil cânceres de mama invasivos e 46 mil carcinomas de mama *in situ* foram detectados nos Estados Unidos; foi previsto que a doença comprometeria cerca de 40 mil vidas naquele ano. A grande maioria das pacientes com carcinomas mamários invasivos foi tratada agressivamente com quimioterapia. Uma vez que o índice de morte ajustado pela idade para câncer de mama nos Estados Unidos não mudou significativamente por quase todo o século XX (Figura 16.2), durante um período em que as terapias mudaram de forma drástica, isso sugeriu que uma grande proporção de carcinomas de mama invasivos que estavam sendo diagnosticados – possivelmente mais do que três quartos – provavelmente não causarão a morte da mulher que o carrega, mesmo sem a intervenção terapêutica, de maneira semelhante aos cânceres de próstata, que são diagnosticados em vastos números no ocidente. Como a triagem para o câncer de mama aumentou e o poder para detectar pequenos tumores, antes não percebidos, melhorou (Figura 16.3), essa disparidade entre a incidência de câncer de mama e mortalidade provavelmente crescerá.

Estatísticas como essas enfatizam a necessidade desesperadora de desenvolver marcadores moleculares que permitam aos oncologistas distinguir entre tumores que realmente necessitam de um tratamento agressivo daqueles que podem ser ignorados ou monitorados periodicamente para sinais de progressão. No caso de outros tipos de câncer, distinções igualmente importantes também devem ser feitas, mas de uma maneira muito mais amarga – entre aqueles cânceres que provavelmente mostrarão alguma resposta a terapia e aqueles que não, nos quais um cuidado misericordioso dita que se deve deixar a doença correr seu curso natural.

Arranjos de expressão gênica, do tipo descrito na Figura 13.18, mostram grandes promessas permitindo que os clínicos **estratifiquem** os cânceres – classifiquem em subgrupos que têm propriedades biológicas e prognósticos distintos. Esses arranjos de expressão gênica, muitas vezes referidos como a ferramenta analítica chave da ciência da *genômica funcional*, permitem ao pesquisador examinar os níveis de expressão de 10 mil ou até mesmo 20 mil genes distintos em uma preparação tecidual. Análises computadorizadas subsequentes desses arranjos de expressão, usando **bioin-**

Figura 16.2 Incidência de câncer de mama vs. mortalidade nos Estados Unidos A incidência de câncer de mama ajustada pela idade tem aumentado constantemente durante as últimas décadas, enquanto a mortalidade por essa doença esteve quase que constante até o final do século XX, quando começou a decair. A maior parte do aumento na incidência parece ser atribuída ao aumento da triagem, mas uma pequena proporção pode ser devida a mudanças reais do índice no qual a doença ataca por causa das mudanças nas práticas reprodutivas, nutrição, etc. (A partir de A. Jemal, T. Murray, E. Ward et al., *CA Câncer J. Clin.* 55:10-30, 2005.)



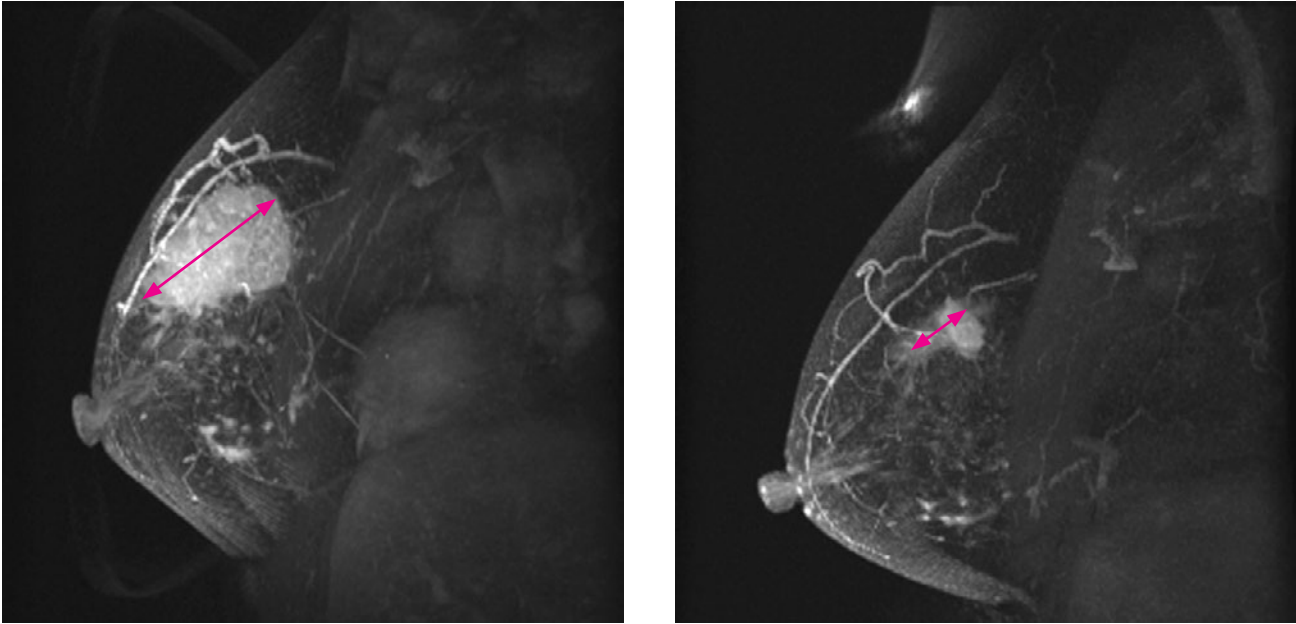


Figura 16.3 Obtenção de imagem de alta resolução de forma não-invasiva dos tecidos humanos O desenvolvimento da obtenção de imagem por ressonância magnética (MRI) permitiu uma resolução muito alta da visualização, de forma *não-invasiva*, dos tecidos vivos. O MRI agora permite que tumores de mama muito pequenos (alguns mm de diâmetro) sejam detectados e, como mostrado aqui, torna possível observar o progresso de uma terapia antitumor – nesse caso, quimioterapia com o agente citotóxico antraciclina – em um detalhe excelente. O uso em amplo espectro de tais técnicas de obtenção de imagem altamente sensíveis provavelmente resultará em aumentos futuros no índice de incidência do câncer de mama. (Cortesia de N.M. Hylton and L.J. Esserman.)

formática, tornaram possível identificar um pequeno subgrupo desses genes cuja expressão (em níveis caracteristicamente altos ou baixos) está correlacionada com um fenótipo biológico específico, resposta à droga ou prognóstico. Por exemplo, a expressão de um grupo de várias dúzias de genes por um tumor pode ser suficiente para servir como um forte profetizador do seu grau de progressão ou da sua associação com um ou outro subtipo de câncer.

No caso de cânceres de mama, existe uma necessidade notória para distinguir aqueles tumores primários que provavelmente se tornarão metastáticos daqueles que permanecerão indolentes e, portanto, provavelmente não irão se espalhar durante o tempo de vida do paciente. Tradicionalmente, os principais parâmetros para um prognóstico que têm sido usados para prever o curso do desenvolvimento do tumor têm sido a idade do paciente, o tamanho do tumor, o estado dos linfonodos da axila, o tipo histológico do tumor, o grau de patologia e o estado dos receptores hormonais (i. e., a expressão dos receptores de estrogênio e de progesterona). Como esses fatores, quando usados separadamente ou em combinação, não geram um prognóstico com um alto grau de exatidão, a grande maioria das pacientes diagnosticadas com cânceres de mama primários nos Estados Unidos tem sido tratada de forma agressiva, mesmo que apenas 15% delas alguma vez desenvolverão uma doença metastática que ameace a vida.

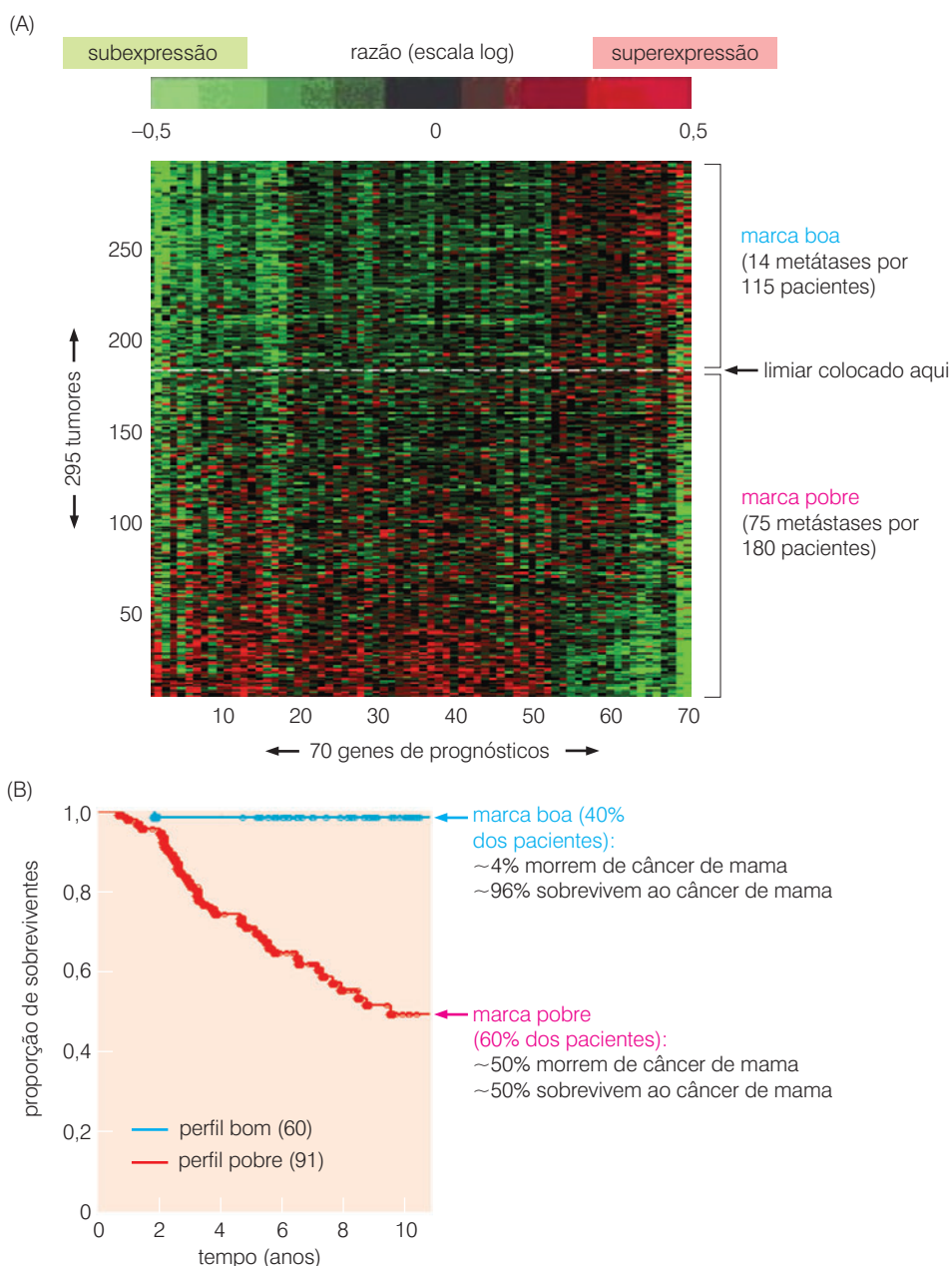
O uso dos arranjos de expressão gênica e da bioinformática tornaram possível prever o curso clínico da progressão do câncer de mama com mais de 90% de exatidão (Figura 16.4), e melhorias adicionais na força de predição estão sendo desenvolvidas. Essa informação altamente acurada do prognóstico mantém a esperança de poupar várias mulheres da exposição à quimioterapia desnecessária. E, no futuro, os detalhes da análise de um arranjo de expressão também poderão informar ao oncologista sobre o protocolo de tratamento que provavelmente vai gerar uma resposta clínica durável ou até mesmo a cura.

Análises como aquelas mostradas na Figura 16.4 são apenas os passos iniciais de um esforço em grande escala para analisar uma variedade de tipos de câncer humano por meio de arranjos de expressão, para estratificar os tipos em subtipos e, com base nas informações que o arranjo gera, planejar terapias adequadas para cada subtipo específico. Por exemplo, linfomas de células B têm representado um dilema para os oncologistas por seus resultados serem tão variados na clínica, com alguns pacientes morrendo dentro de quatro semanas após o diagnóstico enquanto outros estão sendo curados ou estão, no mínimo, alcançando 10 anos de sobrevivência sem sintomas clínicos. Ao mesmo tempo, todos aqueles tumores têm uma aparência muito similar sob o microscópio (Figura 16.5A, topo). Entretanto, o uso dos ar-

ranjos de expressão (abaixo na Figura 16.5A) permitiu que esses tumores fossem segregados em três diferentes doenças com diferenças clínicas resultantes completamente diferentes – linfomas primários de células B mediastinais, linfomas de células do centro germinal semelhantes a células B e linfomas semelhantes a células B ativadas (Figura 16.5B).

Desses três, tanto os linfomas semelhantes a células B ativadas (ABCs) como os linfomas primários de células B mediastinais (PMBLs) exibem altos níveis constitutivos de atividade de NF- κ B (Figura 16.5C); esse fator de transcrição (Seção 6.12) parece estar dirigindo a sua proliferação e, ao mesmo tempo, os protegendo da apoptose. De acordo com isso, drogas que têm como alvo a via NF- κ B, especificamente o seu ativador *upstream*, IKK, têm sido usadas com o objetivo de afetar esses dois subtipos de células DLBCL propagadas em cultura, e, de fato, ambos os grupos de células são mortos uma vez que elas perdem a sua atividade IKK (Figura 16.5D). Células em cultura a partir do terceiro tipo de linfoma, linfomas de células do centro germinal semelhantes a células B, não demonstram alta atividade de NF- κ B e essencialmente não são afetadas por um tratamento desses.

Figura 16.4 A estratificação do câncer de mama pelo uso da genômica funcional (A) Os arranjos de expressão foram utilizados para analisar a expressão gênica de um grupo de 296 cânceres de mama primários diagnosticados em mulheres de menos de 53 anos de idade. O grupo inclui pacientes com células metastáticas nos linfonodos da axila assim como pacientes cujos linfonodos estavam livres de células cancerosas. A análise bioinformática desses tumores foi então empregada para escolher um grupo de 70 “genes de prognósticos” cuja expressão poderia ser utilizada para estratificar esses pacientes com câncer de mama (*arranjados ao longo do eixo vertical*), cujo curso clínico foi acompanhado por um tempo médio de sete anos. Os níveis de expressão desses 70 genes (*arranjados ao longo do eixo horizontal, não foram nomeados*) juntamente com informações sobre história clínica dos pacientes foram então utilizados para determinar um limiar que separava tumores que tinham uma “marca de expressão boa” dos tumores que tinham uma “marca de expressão pobre”. (B) Este gráfico de Kaplan-Meier revela a estratificação de um grupo de 151 pacientes com câncer de mama cuja sobrevivência foi acompanhada por 10 anos após o diagnóstico. Utilizando o critério do painel (A), eles puderam ser separados em dois grupos com cursos clínicos completamente diferentes. Juntando com outros fatores (como a eficiência da quimioterapia), os cálculos indicam que mulheres cujos tumores carregam uma marca de expressão boa virtualmente não obtêm benefícios da quimioterapia adjuvante. (A partir de M.J. van de Vijver, Y.D. He, L.J. Van’t Veer et al., *N. Engl. J. Med.* 347: 1999-2009, 2002.)



A interpretação dos padrões de expressão gênica de tumores de histologia complexa, como os carcinomas compostos tanto de tipos celulares do epitélio como do estroma, é frequentemente confundida com o fato de que os transcritos de RNA que são medidos são uma mistura derivada de múltiplos tipos celulares. A técnica de microdissecação por captura a laser (LCM; veja a Figura 13.23) agora torna possível isolar fisicamente as células epiteliais das do estroma presentes em uma amostra de carcinoma que foi fixada sobre uma lâmina de microscópio. Isso permite que o padrão de expressão gênica dos dois grupos de células seja analisado separadamente, permitindo um refinamento adicional dessas análises e, potencialmente, até mesmo uma estratificação mais acurada das amostras de tumores.

Além dessas análises de expressão gênica, há uma geração de novas ferramentas de diagnóstico envolvendo a ciência da **proteômica**, na qual o espectro de proteínas expressadas

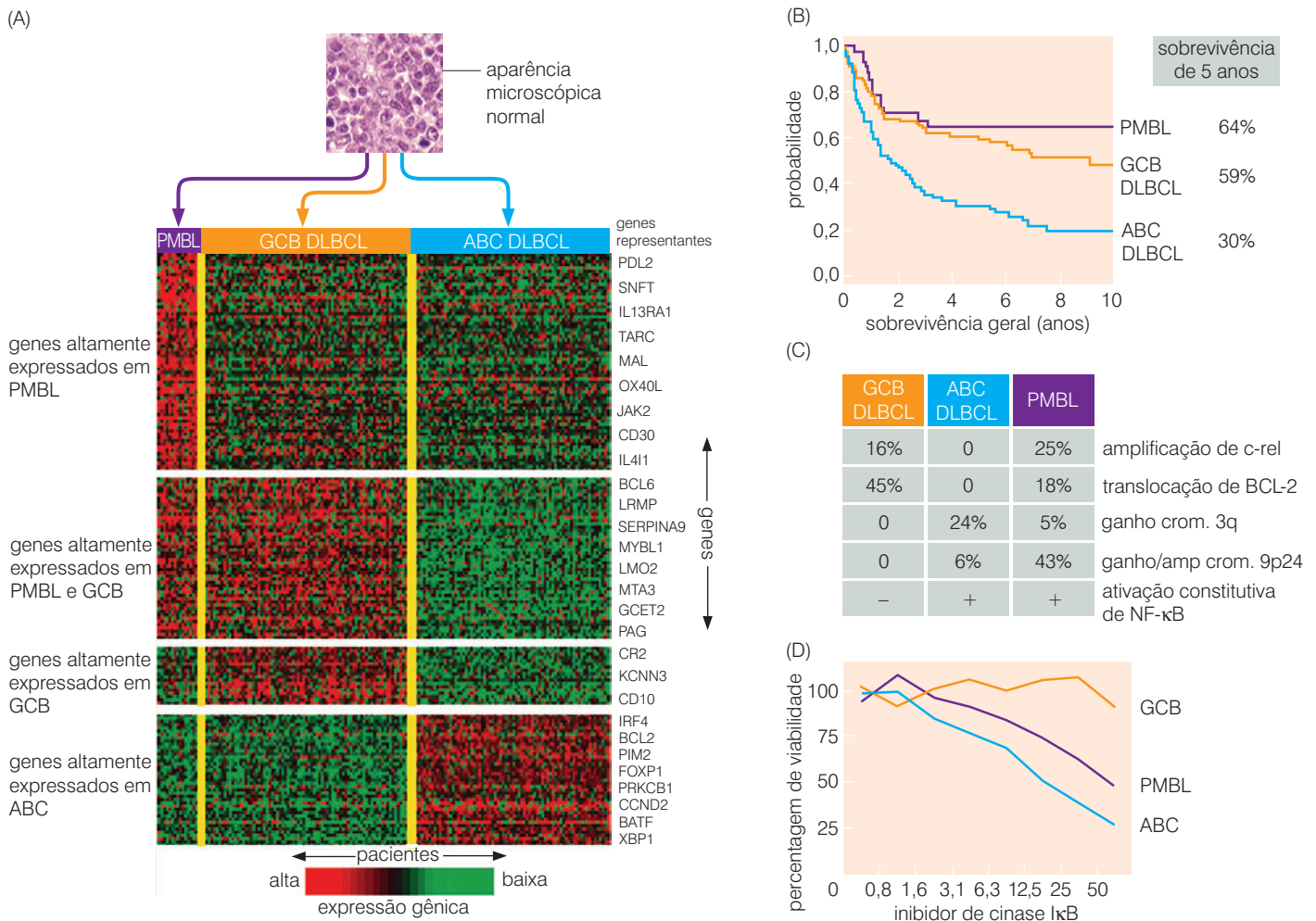


Figura 16.5 Estratificação dos grandes linfomas de células B difusos (A) DLBCLs representam um grupo de vários subtipos de neoplasias de células B que são essencialmente indistinguíveis ao microscópio umas das outras e dos linfomas de células B mediastinais primários (*acima*). Entretanto, o uso de arranjos de expressão gênica (*abaixo*) permite que esses tumores sejam estratificados em três subtipos, chamados de linfomas primários de células B mediastinais (PMBLs), célula B do centro germinal (GCB) DLBCLs e semelhantes a células B ativadas (ABC) DLBCLs. Neste arranjo de expressão, um grupo de genes cujos níveis de expressão têm sido úteis para fazer essa estratificação é colocado ao longo do eixo vertical, enquanto um grupo de tumores de pacientes (*não-marcados*) é colocado ao longo do eixo horizontal. (B) Esta curva Kaplan-Meier ilustra os cursos bastante diferentes da doença que os pacientes com os três subtipos sofrem. (C) Os tumores

que são classificados pelas análises de arranjo de expressão mostrados no painel A exibem alterações cariotípicas e bioquímicas distintas. (D) O fato de PMBLs e ABCs mostrarem níveis constitutivos altos de atividade de NF-κB sugere que eles possam ser particularmente suscetíveis ao rompimento dessa via de sinalização por inibição do ativador *upstream* de NF-κB, IκB cinase (IKK; veja a Figura 6.29). Isso foi observado em experimentos nos quais MLX105, um inibidor farmacológico de IKK, foi aplicado a linhagens celulares derivadas desses três tipos de linfomas e de fato mostraram efeitos diferenciados sobre essas três populações de células crescendo *in vitro*. (A e C, a partir de L.M. Staudt and S. Dave, *Adv. Immunol.* 87:163-208, 2005; B, a partir de A. Rosenwald, G. Wright, K. Leroy et al., *J. Exp. Med.* 198:851-862, 2003; D, a partir de L.T. Lam, R.E. Davis, J. Pierce et al., *Clin. Cancer Res.* 11:28-40, 2005.)

no tumor de um paciente ou soro provê informações críticas para o diagnóstico. O objetivo em longo prazo de todas essas técnicas analíticas – tanto da genômica como da proteômica funcional – é designar cada tumor dos pacientes a um subtipo específico de doença e aplicar terapias com drogas que se mostraram efetivas para tratar um subtipo particular de câncer, mas não para outro, tumores superficialmente similares, para os quais o tratamento possa não ser efetivo. O uso dessas terapias com drogas feitas sob medida mantém a promessa de gerar altos índices de resposta em populações de pacientes rigorosamente definidos.

16.2 Drogas anticâncer bem-sucedidas podem trazer à tona várias respostas a partir de células tumorais

Em princípio, várias estratégias biológicas distintas poderiam mostrar-se igualmente bem-sucedidas na eliminação de tumores estabelecidos ou na manutenção do impedimento do seu crescimento. As mais óbvias dessas foram projetadas para induzir a morte das células cancerosas, normalmente via apoptose. Na verdade, quase todas as estratégias não-cirúrgicas existentes para eliminar células cancerosas levam de uma forma ou outra à ativação das suas vias apoptóticas. Entretanto, uma estratégia terapêutica alternativa conta com a indução da diferenciação, e consideraremos essa primeiro, mesmo que resumidamente.

Como descrito no Capítulo 8, a aquisição do fenótipo maligno está normalmente acompanhada pela diferenciação defectiva e pela entrada, associada, em um estado pós-mitótico. Lembre que, à medida que as populações de células tumorais evoluem para níveis maiores de malignidade, elas normalmente extravasam mais e mais marcadores de diferenciação.

Esses comportamentos sugerem uma estratégia atrativa para tratar tumores: persuadir células cancerosas a se diferenciarem e, assim, entrarem em um estado pós-mitótico. Enquanto aprendemos muito sobre as conexões entre o controle do ciclo celular e a regulação dos programas de diferenciação (veja a Seção 8.11), a maior parte dessa informação ainda não foi traduzida em formas eficazes de terapia. Até agora, a exceção proeminente tem sido uma forma de tratamento da leucemia promielocítica aguda (APL). No curso dessa terapia, as células **blast** leucêmicas não-diferenciadas dessa doença podem ser induzidas a se diferenciar em neutrófilos pelo tratamento com ácido retinóico completamente *trans* (ATRA; Figura 16.6A). O tratamento de pacientes APL com ATRA somado à quimioterapia concomitante frequentemente resulta em **remissões** completas, com índices de sobrevivência de cinco anos chegando de 75 a 85% – sugerindo a cura completa.

Durante o desenvolvimento inicial de APL, o programa normal de diferenciação de certas células hematopoiéticas é bloqueado pelas ações da proteína de fusão chamada de PML-RAR, que resulta de uma translocação cromossomal 15;17 observada nas células leucêmicas de quase todos pacientes APL (Figura 16.6B). Essa proteína híbrida é composta pela proteína PML (leucemia promielocítica), de função normal desconhecida, fusionada à proteína receptora de ácido retinóico nuclear (RAR). A última, imediatamente depois da ligação ao seu ligante de ácido retinóico, é normalmente capaz de induzir a expressão de genes que programam a diferenciação celular em uma variedade de tipos celulares por todo o corpo.

De fato, o mecanismo preciso pelo qual a proteína PML-RAR previne a diferenciação das células leucêmicas promielocíticas não está claro. Uma possibilidade atrativa é que a proteína de fusão PML-RAR encontrada nas células leucêmicas interfere com os poderes de indução de diferenciação dos receptores normais de ácido retinóico (RAR) em células da medula óssea, causando assim o acúmulo de grandes quantidades dessas células em um estado semelhante às células-tronco. (Enquanto RAR ativada pelo ligante age para induzir a expressão de certos genes-alvo associados à diferenciação de células hematopoiéticas precursoras, a proteína de fusão PML-RAR pode agir como uma repressora ou, no mínimo, como antagonista de RAR.) Grande parte do efeito terapêutico do tratamento com ácido retinóico completamente *trans* parece derivar da sua capacidade de induzir ubiquitilação e degradação mediada por

proteossoma da proteína de fusão PML-RAR, resultando no alívio do bloqueio para a diferenciação.

Um mecanismo similar provavelmente explica o sucesso da terapia usando 13-*cis*-ácido retinóico (13cRA; Figura 16.6C), relacionado quimicamente à vitamina A e ao ácido retinóico completamente *trans* descrito anteriormente. Ele tem sido usado com muito sucesso por causar a regressão de lesões pré-malignas na boca e na garganta, prevenindo e atrasando, dessa forma, a sua progressão para cânceres de cabeça e pescoço. De forma interessante, a perda da expressão de RAR β é freqüentemente observada nesses crescimentos pré-malignos, assim como em uma variedade de outros carcinomas humanos, ostensivamente porque ele ajuda as células nessas várias lesões a prevenir a entrada em um estado pós-mitótico diferenciado. Além disso, a redução da expressão do receptor de RAR β em camundongos, conseguida pelo uso de um transgene anti-senso, resulta na formação de um grande número de carcinomas de pulmão pelos 18 meses de idade, fornecendo um suporte adicional para a idéia de que a evasão da diferenciação induzida pelo ácido retinóico serve como um mecanismo importante de patogênese do carcinoma.

Além desses dois exemplos impressionantes, estratégias que induzem a diferenciação têm tido sucesso limitado no tratamento de cânceres estabelecidos. Por essa razão, várias terapias para os cânceres que estão em desenvolvimento são direcionadas para a ativação de sinais pró-apoptóticos dentro das células do câncer. Ao primeiro olhar, os esforços para despertar a

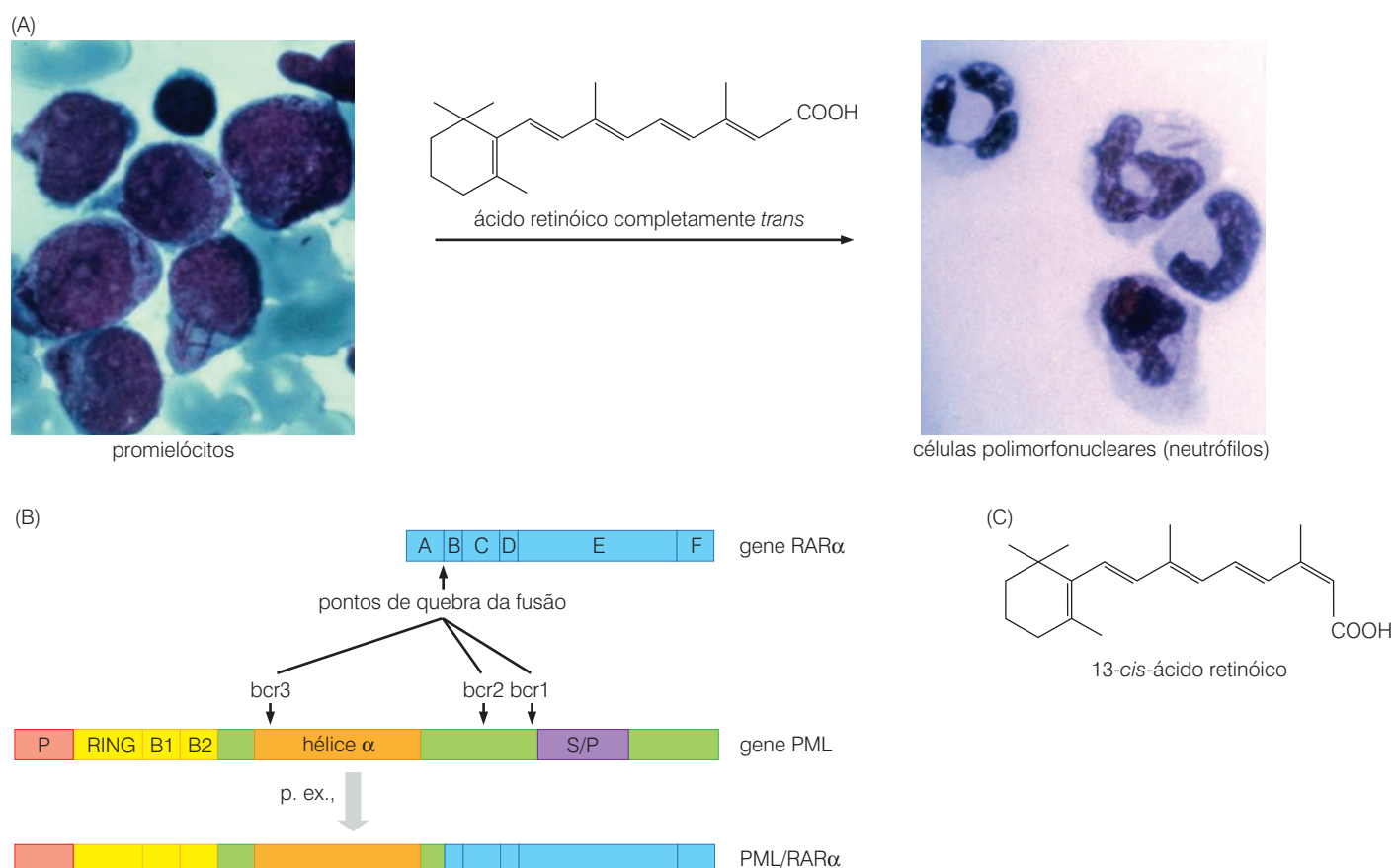


Figura 16.6 Diferenciação induzida das células da leucemia promielocítica aguda (A) Na leucemia promielocítica aguda (APL), o grande número de promielócitos que carregam vários grânulos no seu citoplasma estão aparentes na circulação (*esquerda*). Entretanto, depois do tratamento com ácido retinóico completamente *trans* (ATRA), esses promielócitos imaturos desaparecem e são substituídos por mielócitos diferenciados, especificamente os neutrófilos polimorfonucleares (PMN) (*direita*). (B) Em 99% dos casos de APL, uma translocação envolvendo os

Cromossomos 17 e 11 resulta na fusão do gene que codifica para o receptor de ácido retinóico (RAR) com o gene para a leucemia promielocítica (PML). Uma vez formada, a proteína de fusão resultante parece bloquear a diferenciação de promielócitos acionada por RAR. (C) O 13-*cis*-ácido retinóico tem sido usado por causar a regressão dos precusores pré-malignos dos carcinomas de cabeça e pescoço. (A, cortesia de P.P. Pandolfi; B, adaptada a partir de S. Kalantry, L. Delva, M. Gaboli et al., *J. Cell Physiol.* 173:288-296, 1997.)

resposta apoptótica nas células do câncer pode parecer representar uma tarefa fútil, uma vez que lemos anteriormente sobre o número de caminhos pelos quais as células do câncer desativam a sua maquinaria apoptótica (Seção 9.15). Mas a complexidade e a redundância funcionais do circuito apoptótico ditam que, quase inevitavelmente, componentes importantes desse circuito permanecem intactos mesmo nos tumores mais agressivos. São esses componentes, ainda funcionais, que podem ser alvos de ativação, direta ou indireta, para eliminar células tumorais do organismo de pacientes com câncer. Estamos apenas começando a aprender como prever a suscetibilidade dos tumores a certas terapias indutoras de apoptose.

Várias das estratégias terapêuticas em desenvolvimento são planejadas para matar as células cancerosas privando-as dos sinais antiapoptóticos que as sustentam. Como lemos no Capítulo 9, as células cancerosas frequentemente dependem da sinalização de fatores de crescimento hiperativos para gerar sinais antiapoptóticos intracelulares (p. ex., aqueles liberados por Akt/PKB) que suprimem as ações do circuito pró-apoptótico. Terapias efetivas para o câncer poderiam ser planejadas para interferir nessas sinalizações em uma ou outra etapa das cascatas de sinalização *upstream* que regulam a atividade Akt/PKB.

Um grupo alternativo de estratégias terapêuticas toma vantagem da vulnerabilidade que as células do câncer têm uma vez que elas descartaram controles de ponto de checagem críticos que funcionam durante o ciclo normal da célula. Por exemplo, algumas células cancerosas não têm o controle do ponto de checagem que normalmente bloqueia a entrada na mitose (fase M) a partir da fase G_2 enquanto danos significativos no DNA genômico ou nos cromossomos não tiverem sido reparados. Conseqüentemente, o tecido tumoral pode ser tratado pela imposição de danos genômicos por quimioterápicos ou radiação. Enquanto células normais se atrasarão e repararão esses danos antes de avançar para a fase M, as células cancerosas podem ignorá-los e, como consequência, proceder para a mitose, em que podem entrar em uma “catástrofe mitótica” que ameaça a sua viabilidade contínua quando, mais tarde, na fase M, elas tentam segregar seus cromossomos ainda danificados (Figura 16.7). Esse dano pode ser tão devastador que consegue acionar as respostas apoptóticas residuais que tais células possuem. Na verdade, vários dos terapêuticos contra o câncer usados tradicionalmente são suspeitos de tomar vantagem desses defeitos no controle dos pontos de checagem para destruir as células cancerosas, mas uma evidência sólida para sustentar esse ponto ainda não está em mãos. Entretanto, na discussão que segue, daremos enfoque aos agentes que têm como alvo proteínas críticas em vez do genoma de células cancerosas.

16.3 Considerações funcionais ditam que apenas um subgrupo de proteínas defectivas nas células cancerosas é alvo atrativo para o desenvolvimento de drogas

Pesquisadores interessados em desenvolver novas drogas anticâncer altamente específicas que são direcionadas para tratar certos tipos de câncer são confrontados pelo fato de que, com raras exceções, as drogas – normalmente compostos orgânicos de baixo peso molecular –

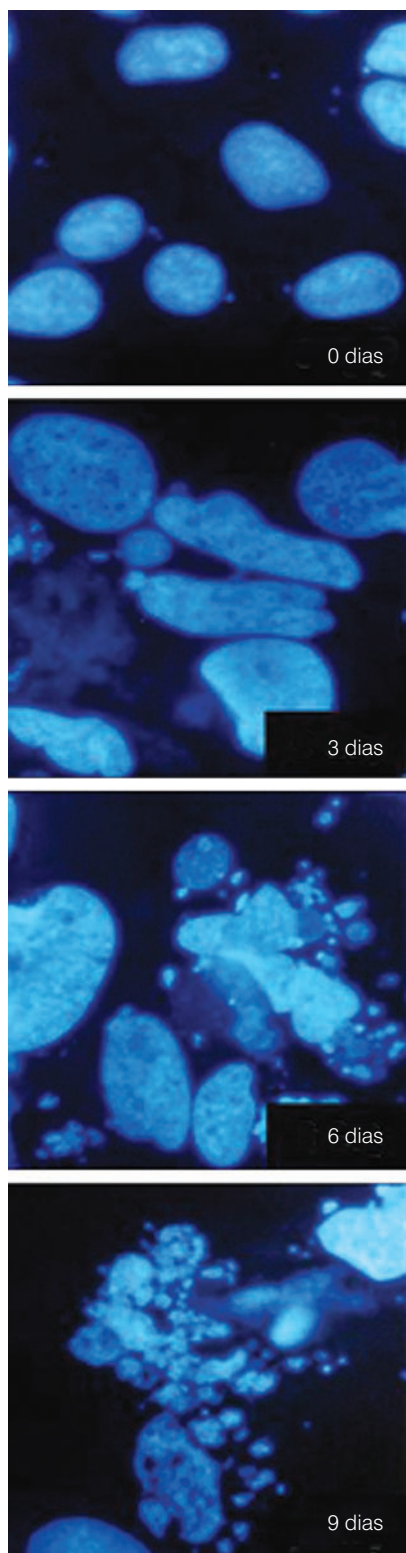


Figura 16.7 Quimioterapia e catástrofe mitótica Várias drogas quimioterápicas podem danificar os cromossomos das células do câncer. Como as células cancerosas não possuem os controles do ponto de checagem G_2/M , elas podem avançar para a mitose sem ter reparado o dano cromossomal. Isso pode levá-las a entrar em “catástrofe mitótica”, que resulta em aneuploidia, poliploidia, formação de micronúcleos e, por fim, morte dessas células. Vistos aqui estão os efeitos de baixas doses (50 ng/mL) de doxorrubicina, uma droga quimioterápica amplamente utilizada, nas células Huh-7 de hepatoma humano. Durante um período de nove dias, o núcleo dessas células aumentou ou diminuiu, e vários finalmente se fragmentaram em micronúcleos, cada qual carregando um pequeno número de cromossomos; isso finalmente leva à morte celular, com frequência por apoptose. (A partir de Y.W. Eom, M.A. Kim, S.S. Park et al., *Oncogene* 24: 4765-4777, 2005.)

inibem funções bioquímicas em vez de estimulá-las. Esse simples fato reduz de forma drástica as opções para o desenvolvimento de drogas anticâncer.

Como vimos no Capítulo 7, os produtos protéicos dos genes de supressão de tumores – os *gatekeepers* – contribuem para o desenvolvimento do câncer pela sua ausência, e esforços para desenvolver compostos de baixo peso molecular para substituir ou replicar essas funções perdidas são implausíveis atualmente e podem permanecer assim para sempre. Os poucos sucessos representam relativamente uma minoria de vitórias. Por exemplo, certos compostos podem restaurar algumas funções de p53 mudando formas mutantes da proteína p53 de suas configurações estereoquímicas funcionalmente defectivas de volta para a configuração do tipo selvagem.

Exatamente os mesmos argumentos se aplicam às proteínas responsáveis pela manutenção do genoma da célula – as *caretakers* (Capítulo 12). Mais uma vez, suas funções, freqüentemente perdidas pelas células cancerosas, não podem ser restauradas nem mesmo pelas moléculas mais complexas de drogas. E mesmo se fossem, pouca utilidade derivaria desse sucesso. Depois de tudo, se a progressão dos tumores fosse orientada pelo reparo defectivo do DNA e pelo acúmulo resultante de alelos mutantes, a restauração da função de reparação perdida não teria efeito sobre várias seqüências mutantes que já teriam se acumulado no genoma de uma célula cancerosa.

Uma vez que *gatekeepers* e *caretakers* são desconsiderados, essa lógica deixa as oncoproteínas – formas hiperativas de crescimento celular normal ou proteínas promotoras da sobrevivência – como os alvos mais atrativos para o desenvolvimento de terapias anticâncer. Essas são moléculas que, em princípio, podem ser inibidas por drogas, resultando na redução da sua atividade e, com sorte, no colapso do programa de crescimento neoplásico. Na verdade, as proteínas de transdução de sinal imediatamente *downstream* às oncoproteínas hiperativas também são alvos atrativos, uma vez que a maioria destas também é executora positiva importante da sinalização (veja, por exemplo, a Figura 16.8).

Certas considerações genéticas podem restringir mais adiante o espectro de moléculas que são alvos atrativos para o desenvolvimento de drogas antitumorais. Anteriormente, aprendemos que, na medida em que a progressão do câncer continua, a população de células adquire uma sucessão de alterações genéticas e, desta forma, bioquímicas, que finalmente as levam para o estado de crescimento neoplásico (Capítulo 11). Esse cenário levanta uma questão provocante: as alterações

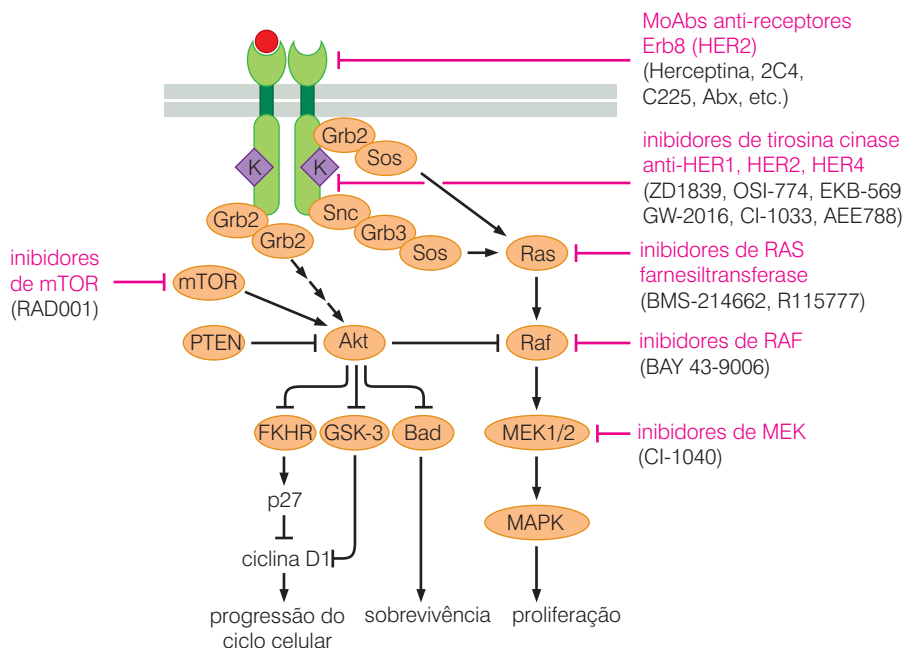
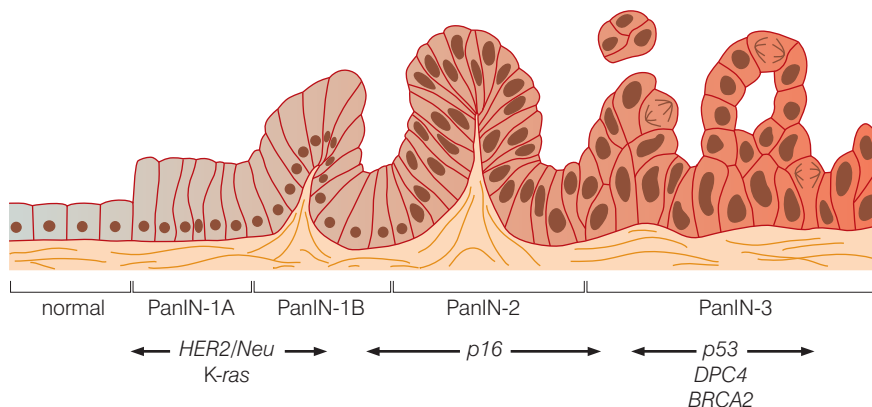


Figura 16.8 Inibição do crescimento tumoral tendo como alvo elementos sinalizadores *downstream*. Como indicado neste diagrama, a sinalização a partir de receptores como EGF (HER1) e HER2/Neu pode ser bloqueada de várias maneiras. Os ectodômios dos receptores podem ser alvo de anticorpos monoclonais, como a Herceptina. Além disso, os domínios emissores de sinal da tirosina cinase desses receptores podem ser alvo de uma variedade de compostos de baixo peso molecular. Entretanto, além disso, várias drogas foram desenvolvidas, as quais têm como alvo proteínas que funcionam como componentes das vias de sinalização *downstream*, incluindo aquelas que inibem Ras (pela inibição da sua maturação pós-traducional envolvendo farnesilação), assim como Raf e MEK (pela inibição das suas funções catalíticas serina/treonina cinase) e mTOR (pela inibição da formação de complexos de sinalização funcional entre mTOR e proteínas parceiras associadas). (Cortesia de J. Baselga.)

Figura 16.9 Progressão do câncer pancreático Uma questão-chave na identificação de alvos para intervenção terapêutica é se as alterações genéticas e proteínas mutantes que surgem em um tumor de progressão em múltiplas etapas continuam a ser necessárias muito mais tarde, quando um tumor totalmente estabelecido aparece. Por exemplo, uma série de entidades histológicas chamadas de PanINs (neoplasias pancreáticas intra-epiteliais) foram definidas como estágios discretos na progressão inicial de tumores pancreáticos. Em PanIN-A, o oncogene K-ras é freqüentemente encontrado em um estado mutante ativado, fazendo surgir a questão de se a sua atividade continuada é necessária muito mais tarde, quando os carcinomas pancreáticos invasivos e metastáticos (*não-mostrados*) finalmente surgem. (A partir de R.E. Wilentz, C.A. Iacobuzio-Donahue, P. Argani et al., *Cancer Res.* 60:2002-2006, 2000.)



que são responsáveis pelas etapas *primárias* da progressão, de múltiplas etapas, dos tumores continuam a exercer papéis críticos muito *mais tarde*, quando a explosão máxima do fenótipo maligno foi finalmente adquirida? Por exemplo, se a etapa inicial no desenvolvimento de um tumor envolveu a formação de um oncogene *ras*, então as ações contínuas desse oncogene ainda são necessárias, mais tarde, para as células descendentes altamente malignas? Ou algumas das alterações que ocorrem mais tarde durante a progressão do tumor tornam os serviços contínuos de uma oncoproteína Ras desnecessários?

Tome o caso dos carcinomas pancreáticos, nos quais o oncogene K-*ras* é encontrado na grande maioria dos tumores (~90%). A aquisição desse oncogene ocorre relativamente cedo na progressão do tumor, uma vez que os oncogenes K-*ras* mutantes são freqüentemente encontrados nas neoplasias pancreáticas intra-epiteliais (PanINs; Figura 16.9), os precursores benignos dos carcinomas puros. Algumas das alterações subsequentes adquiridas nos, por exemplo, genes *Smad4/DPC4* e *p16^{INK4A}* tornam a oncoproteína K-Ras4B supérflua? Se positivo, drogas projetadas para bloquear a sinalização de K-Ras nunca se mostrarão úteis para tratar essa classe de cânceres.

Podemos obter algum estímulo a partir de alguns modelos em camundongos para o desenvolvimento do câncer (Tabela 16.1). O oncogene responsável por iniciar a progressão de tumores nesses camundongos transgênicos pode ser desligado experimentalmente várias semanas mais tarde nos tumores que finalmente se formam. Tais experimentos têm explorado o oncogene H-*ras* para criar melanomas, o oncogene K-*ras* para induzir adenocarcinomas de pulmão, o oncogene *bcr-abl* para criar leucemias e o oncogene *myc* para produzir tumores de células das ilhotas do pâncreas, assim como leucemias e linfomas. Em todos esses casos, as

Tabela 16.1 Efeitos do desligamento da expressão de um transgene oncogênico iniciador em um camundongo com tendência a tumor^a

Oncogene transgênico	Resposta dos tumores
Regressão permanente após o desligamento do transgene	
H- <i>ras</i>	colapso do melanoma
K- <i>ras</i>	regressão do adenocarcinoma de pulmão
<i>bcr-abl</i>	regressão da leucemia de células B
<i>myc</i>	regressão do linfoma de células T e leucemia mielogenosa aguda
<i>fgf-7</i>	regressão da hiperplasia de epitélio de pulmão
SV40 <i>large T</i>	hiperplasia de glândula salivar regrediu quando o transgene expressou < 4 meses
Persistência ou recidiva após o desligamento do transgene	
SV40 <i>large T</i>	houve recidiva da hiperplasia de glândula salivar quando o transgene expressou > 4 meses
<i>neu</i>	recidiva do adenocarcinoma de mama
<i>myc</i>	persistência do adenocarcinoma de mama
<i>wnt</i>	persistência do adenocarcinoma de mama

^a Adaptada, em parte, a partir de D.W. Felsher, *Curr. Opin. Genet. Dev.* 14:37-42, 2004.

células tumorais que surgem continuam a ser dependentes dos oncogenes iniciadores, como indicado pela regressão desses tumores, uma vez que a expressão dos oncogenes iniciadores é desligada. O comportamento de certas células tumorais humanas também indica as contribuições contínuas de elementos genéticos iniciadores (veja, por exemplo, a Barra lateral 16.1).

Entretanto, experimentos com uma outra linhagem de camundongo, que carrega um oncogene *myc* transgênico, geraram um resultado igualmente dramático, mas bastante diferente: o desligamento da expressão de *myc* primeiro causou a regressão dos linfomas induzidos por transgene, mas houve recidiva dos tumores em cerca de 20% desses camundongos; as células dos linfomas recidivantes invariavelmente mostraram alterações adicionais no cariótipo além daquelas que estavam presentes nos primeiros tumores formados. Isso sugere que o transgene *myc*, além de acionar inicialmente a formação do linfoma, encoraja a formação de alterações genéticas nas células tumorais que tornam suas ações contínuas desnecessárias mais tarde. Observações como essas claramente complicam ter como alvo certas oncoproteínas iniciadoras de tumor para a inativação por drogas anticâncer, uma vez que essas proteínas podem não estar mais tendo um papel crítico, anos mais tarde, na manutenção da viabilidade e do crescimento de células tumorais.

16.4 A bioquímica de proteínas também determina se elas são alvos atrativos para intervenção

As sutilezas bioquímicas das proteínas que foram escolhidas como alvos atrativos para intervenção por drogas complicaram os esforços, mais adiante, para desenvolver novas drogas anticâncer. Essas drogas são, quase invariavelmente, compostos orgânicos de baixo peso molecular, uma vez que, em geral, (1) tais moléculas são sintetizadas muito mais facilmente do que moléculas de peso molecular mais alto; e (2) moléculas pequenas provavelmente penetram mais nos interstícios de um tumor, exercendo, dessa forma, efeitos terapêuticos em todas as suas células componentes.

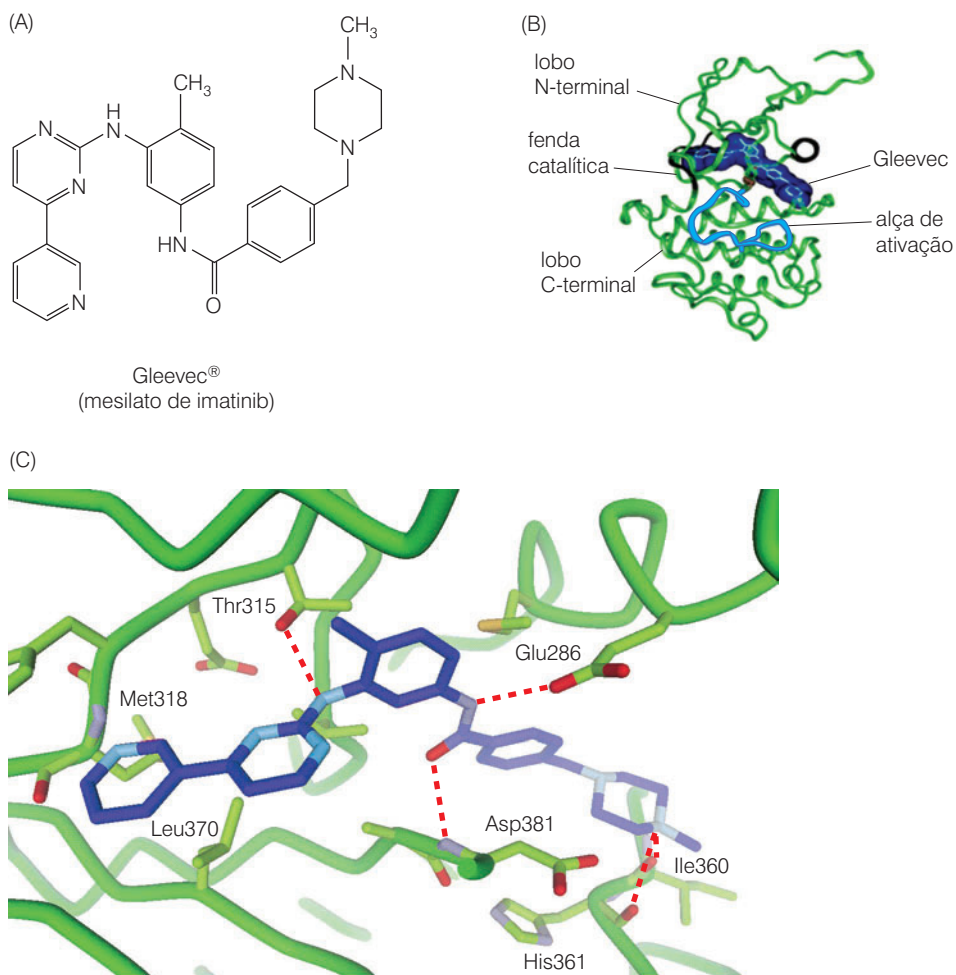
Moléculas-alvo, por seu lado, devem ter domínios dentro das suas estruturas que são capazes de interações fortes e específicas com moléculas pequenas de drogas. Químicos farmacêuticos que têm a intenção de mandar drogas para dentro de células cancerosas para atacar alvos específicos colocam esses alvos moleculares em potencial (p. ex., oncoproteínas) em duas categorias principais – aqueles que são **promissores para o desenvolvimento de drogas** e aqueles que não são. “Potencial para o desenvolvimento de drogas” implica que a molécula-alvo tem uma estrutura que indica que ela deva ser vulnerável ao ataque e inibição por compostos de baixo peso molecular. Dadas essas e outras restrições, moléculas-alvo são sempre proteínas de vários tipos.

Uma proteína é considerada promissora para o desenvolvimento de drogas se ela carrega uma função enzimática reconhecível, assim como uma fenda catalítica bem-definida que ela usa para realizar essa função. Essas fendas são atrativas para os que desenvolvem drogas, porque elas normalmente representam cavidades relativamente pequenas que podem ligar pequenas moléculas orgânicas de maneira altamente específica. Por isso, tais cavidades com frequência tornam possível que um composto de baixo peso molecular forme ligações não-covalentes simultaneamente com múltiplos resíduos de aminoácidos que revestem suas paredes (Figura 16.10). Tais contatos múltiplos independentes permitem que uma molécula da droga se ligue à proteína-alvo com grande especificidade e avidez. Igualmente importante, tal ligação tem uma alta probabilidade de perturbar a função da proteína, uma vez que a molécula da droga ocupa um domínio funcionalmente crítico da proteína.

Proteínas que não têm essas fendas catalíticas são frequentemente descartadas por serem “não-promissoras para o desenvolvimento de drogas”. Acredita-se muito que fatores de transcrição, por exemplo, não sejam (justa ou injustamente) promissores para o desenvolvimento de drogas, porque em geral eles não têm fendas catalíticas e, portanto, os tão procurados bolsões de ligação à droga. Essas considerações colocam os fatores de transcrição de oncoproteínas, como Myc e Fos, na categoria dos alvos não-promissores para o desenvolvimento de drogas e, ao mesmo tempo, per-

Barra lateral 16.1 Células HeLa fornecem o exemplo mais dramático da importância progressiva das lesões genéticas iniciadoras Discutivelmente, o exemplo mais extremo da influência contínua de lesões genéticas iniciadoras é fornecido pelo comportamento das células da linhagem celular do câncer cervical humano de HeLa. Lembre que essas células derivaram, em 1951, de um carcinoma cervical altamente agressivo e, como quase todos (> 99,7%) os carcinomas cervicais, o início desse tumor é rastreável para uma infecção por papilomavírus humano (HPV) – nesse caso, HPV tipo 18 e suas duas oncoproteínas codificadas, E6 e E7. Cinquenta anos mais tarde, tempo durante o qual células HeLa em cultura passaram por vários milhares de ciclos de crescimento e divisão, estratégias genéticas foram usadas para desligar os oncogenes HPV18, sendo expressos nessas células. O desligamento da expressão de E7 levou à reativação da função pRb e à senescência celular, enquanto o desligamento de E6 levou ao reaparecimento de p53 e subsequente senescência ou apoptose nessas células. Portanto, nesse caso, a alteração genética de início (aquisição de um genoma de HPV) continuou a ser absolutamente essencial para a manutenção da proliferação das células cancerosas e para a viabilidade de milhares de gerações celulares mais tarde.

Figura 16.10 Múltiplos contatos entre drogas e seus alvos (A) A estrutura química de Gleevec, que foi desenvolvida para inibir a atividade de tirosina cinase da proteína de fusão ativa Bcr-Abl na leucemia mielogenosa crônica (CML), foi o resultado da otimização da estrutura de um componente precursor no qual certas cadeias laterais foram adicionadas, enquanto outras foram removidas, com o objetivo de melhorar a ligação de drogas à fenda catalítica do domínio tirosina cinase de Abl. (B) A fenda catalítica da cinase Abl é encontrada entre os lobos N e C terminais, mostrados aqui como estruturas em fita verdes. Um modelo espaço preenchido (com raios de van der Waals) de uma molécula Gleevec está mostrado em azul-escuro, enquanto a "alça de ativação" de Abl, que normalmente bloqueia o acesso da fenda catalítica aos substratos, está mostrada em azul-claro. (Essa alça de ativação sai do caminho quando a cinase muda para sua configuração ativa.) (C) A associação ávida e específica de Gleevec (magenta) com a fenda catalítica de Abl depende da formação de múltiplas pontes de hidrogênio (linhas vermelhas tracejadas), assim como de interações van der Waals mais fracas (não-mostrado). Essas ligações aumentam a afinidade de ligação da droga pela proteína; ao mesmo tempo, elas explicam a especificidade da associação, uma vez que os vários pares de prótons doadores e aceptores, que participam como parceiros na formação de pontes de hidrogênio, devem estar precisamente posicionados no espaço tridimensional. (A e B, a partir de B. Nagar, W.G. Bornmann, P. Pellicena et al., *Cancer Res.* 62:4236-4243, 2002; C, cortesia de E. Buchdunger, S.W. Cowan-Jacob, G. Fendrich, J. Liebetanz, D. Fabbro and P.W. Manley. Novartis Pharmaceuticals.)



mitem que várias cinases envolvidas na formação do câncer sejam colocadas no campo das moléculas-alvo promissoras para o desenvolvimento de drogas. (As maiores exceções com relação à falta de potencial para o desenvolvimento de drogas dos fatores de transcrição são criadas pelos receptores dos hormônios nucleares, como os receptores de estrogênio e progesterona. Como têm domínios de ligação a hormônios, essas proteínas receptoras são, em princípio, vulneráveis a interrupção por pseudoligantes, como tamoxifeno, que se liga e antagoniza certas funções do receptor de estrogênio.) Em média, químicos farmacêuticos sentenciam cerca de 1 em 5 proteínas celulares para serem promissoras para o desenvolvimento de drogas.

A presença de uma função catalítica identificável e o aparente potencial para desenvolvimento de drogas não garante, por si só, que um alvo atrativo tenha sido identificado. Considere, por exemplo, o caso da oncoproteína Ras, que tem uma atividade catalítica claramente identificável – sua função de GTPase. Essa atividade enzimática nas células que expressam Ras nunca foi objeto do desenvolvimento de drogas, porque a GTPase de Ras, como aprendemos na Seção 5.9, funciona como um regulador *negativo* da sinalização de Ras. A sua inibição apenas aumentaria os efeitos já desastrosos da substituição de aminoácidos que criaram as oncoproteínas Ras pela primeira vez. O mesmo pode ser dito de algumas tirosina fosfatases, cujos papéis designados são para reverter os efeitos promotores do crescimento das tirosina cinases. Em resposta à dificuldade de atacar a própria proteína Ras, uma variedade de estratégias para o desenvolvimento de drogas deu enfoque, então, às enzimas que modificam esta proteína e assim permitem que se torne funcional.

A noção de que cavidades moleculares fornecem um alvo atrativo para o desenvolvimento de drogas também pode sugerir que vários tipos de interações proteína-proteína representam

alvos promissores para o desenvolvimento de drogas. Depois de tudo, o espaço confinado entre duas proteínas fisicamente justapostas poderia parecer criar um bolsão de ligação à droga, altamente específico, e a inserção de uma droga em uma cavidade como essa poderia desestabilizar ou bloquear a interação proteína-proteína. Candidatos óbvios para tal inibição são os vários tipos de pares ciclina-Cdk, cujas ações direcionam a proliferação de todas as células do câncer (Capítulo 8).

Infelizmente, a maioria dos esforços para prevenir essas ou outras associações proteína-proteína por meio de moléculas de drogas sob medida não têm tido sucesso. As inúmeras falhas têm sido racionalizadas como segue: a associação de duas proteínas uma com a outra envolve múltiplos pontos de ligação entre as suas faces que interagem. Esses pontos de contato se estendem sobre os domínios moleculares que excedem muito as dimensões de moléculas de drogas, que tipicamente têm, de preferência, um baixo peso molecular (p. ex., $< 10^3$). Como consequência, apenas uma pequena fração dos pontos de contato entre duas proteínas que se associam pode ser bloqueada por qualquer uma dessas drogas, e a associação como um todo permanece essencialmente não-perturbável.

Uma exceção para esse conhecimento amplamente aceita foi anunciada no final de 2003, quando um composto de baixo peso molecular que inibe a formação do complexo Mdm2-p53 (Seção 9.7) foi descrito (Figura 16.11A). Esse desenvolvimento significa que, em princípio, a ausência da proteína p53 observada em vários tipos de tumores humanos – frequentemente resultando na perda da expressão de p14^{ARF} ou na superexpressão de Mdm2 – pode ser revertida pelo tratamento com drogas.

Dentro de meses, mais quebradores de regras foram reportados. Foi observado que compostos que ocorrem naturalmente, isolados dos chás verde e preto, bloqueiam a ligação e a neutralização de proteínas BH3 pró-apoptóticas pelas proteínas antiapoptóticas Bcl-2 e Bcl-X_L, realizando isso a concentrações relativamente baixas (Figura 16.11B). Foi observado também que um composto, ICG-001, identificado por triagem em larga escala (HTS), era capaz de inibir a associação de β -catenina com CBP (proteína ligadora do elemento de resposta a AMP cíclico), um co-ativador transcricional de atuação ampla que funciona com a β -catenina para induzir a expressão de genes-chave, incluindo o gene que codifica para survivina (veja a Tabela 9.5 e a Seção 9.13), uma importante proteína IAP antiapoptótica (Figura 16.11C), assim como a ciclina D1. Um ano mais tarde, um outro inibidor das proteínas antiapoptóticas Bcl-2, Bcl-X_L e Bcl-w foi anunciado. Esse, também produto de química orgânica sintética (Figura 16.11D), se associa a essas proteínas antiapoptóticas com uma afinidade de aproximadamente 1 nM – com uma avidez, de mais de duas ordens de magnitude, maior do que o composto do chá.

Agentes que funcionam como o inibidor da β -catenina mantêm a promessa de serem úteis no tratamento de carcinomas de cólon. Como vimos, o acúmulo desregulado de β -catenina tem um papel-chave na patogênese de quase todos esses cânceres, resultando na associação dessa proteína com fatores de transcrição Tcf/Lef no núcleo e uma expressão excessiva de uma clientela de genes alvo chave, como aqueles que codificam para ciclina D1 e Myc (Seção 7.11). Uma vez reunido aos genes promotores no núcleo, o complexo β -catenina-Tcf/Lef recruta várias proteínas adicionais, como o co-ativador transcricional CBP; o último auxilia no remodelamento da cromatina em torno de sítios promotores. A droga ICG-001 inibe a associação de β -catenina-Tcf com CBP, resultando na perda de atividade indutora de transcrição por esse complexo. De um modo mais geral, sucessos como os quatro listados certamente encorajam esforços realizados por outros pesquisadores na descoberta de inibidores farmacológicos de interações chave entre proteínas.

No entanto, esses sucessos conduzem a uma lição maior, de que as cinases estão entre as poucas classes de moléculas celulares que são alvos promissores para o desenvolvimento de drogas para terapia anticâncer. Como temos visto, várias dessas cinases funcionam como oncoproteínas que atuam para dirigir a proliferação neoplásica e, ao mesmo tempo, são enzimas que possuem fendas catalíticas bem-definidas. Lembre que pelo menos 518 genes que codificam para cinases distintas foram enumerados no genoma humano, dos quais 90 codi-

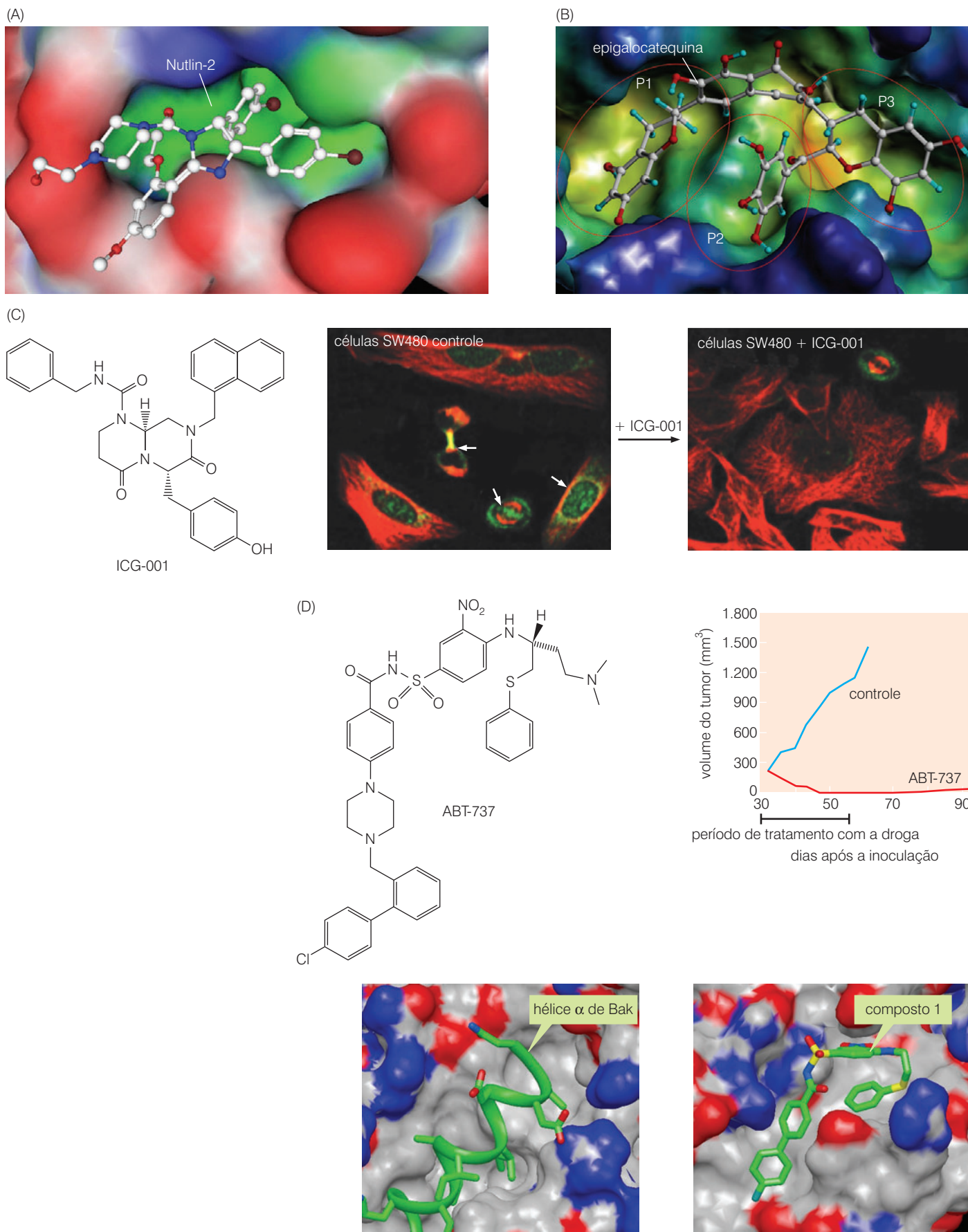


Figura 16.11 Inibidores da interação entre proteínas (A) Uma busca por compostos que inibem a ligação de Mdm2-p53 resultou na descoberta de Nutlin-2, que se associa com o bolsão de ligação a p53, cuja superfície está mostrada aqui. O fundo do bolsão é hidrofóbico e, por isso, está em *verde*, enquanto porções ao lado do bolsão que são hidrofílicas estão em *azul*. Aqueles resíduos de aminoácidos que estão expostos ao solvente estão em *vermelho*. O composto Nutlin-2 está mostrado aqui como uma figura em bastão com átomos de carbono (*branco*), nitrogênio (*azul*), oxigênio (*vermelho*) e bromina (*marrom*). Ele compostos intimamente relacionados previnem a degradação de p53 mediada por Mdm2 e induzem a apoptose de células cancerosas, alcançando ambos os efeitos em baixa ordem de concentração, micromolar. (B) Os efeitos saudáveis ditos provenientes do hábito de beber chás preto e verde têm sido atribuídos a muitos dos constituintes das folhas de chá, alguns dos quais induzem apoptose nas células tumorais em concentrações muito baixas. Epigallocatequina galato (EGCG; *figura em bastão*) extraída do chá verde se liga à importante proteína Bcl-X_L antiapoptótica com uma constante inibitória (K_i) de 490 nM, e a Bcl-2, a uma K_i de 335 nM. (Os valores dessas constantes refletem a concentração na qual 50% da atividade dessas proteínas é inibida; valores na ordem submicromolar são indicativos de alta potência.) Uma combinação de três tecnologias – ensaios de ligação por ressonância magnética nuclear (NMR), ensaios de polarização por fluorescência e *docking* computacional – foi utilizada para produzir essa imagem, que mostra o *docking* de EGCG em três bolsões hidrofóbicos adjacentes de Bcl-X_L (*amarelo e verde*), cujas superfícies moleculares estão mostradas aqui e marcadas como P1, P2 e P3. Esses bolsões, juntos, constituem um domínio hidrofóbico que Bcl-X_L, que é superexpresso em várias células cancerosas, utiliza para ligar e neutralizar proteínas BH3-only pró-apoptóticas (veja as Figuras 9.25 e 9.27). (C) A pequena molécula ICG-001 (*esquerda*) inibe a associação do complexo β -catenina-Tcf/Lef com o co-ativador transcricional CBP. O complexo do fator de transcrição é responsável por induzir, entre outros genes, a expressão do gene que codifica para survivina, um inibidor-chave de apoptose (IAP; veja a Seção 9.13). Como visto aqui, a expressão de survivina (*verde*, *imunofluorescência amarela*, *ambos no painel esquerdo*) que está normalmente presente nas células SW480 do carcinoma humano de cólon (*setas*) está fortemente reduzida pela presença de ICG-001; tubulina (*vermelho*) é utilizada em ambos os casos como um *controle*. A concentração de ICG-001 usada neste experimento causa uma redução de aproximadamente seis vezes na atividade do promotor do gene da survivina (*não-mostrado*). (D) Um composto chamado ABT-737 (*primeiro painel*) foi desenvolvido, utilizando uma triagem baseada em ressonância magnética nuclear (NMR), síntese paralela e desenho baseado na estrutura para visualizar a interação das estruturas de uma proteína pró-apoptótica (Bak) e moléculas candidatas a drogas (composto 1). Assim, a hélice α da proteína Bak pró-apoptótica (*hélice verde*, *terceiro painel*; veja a Figura 9.25) que se liga e inibe a proteína Bcl-X_L antiapoptótica (*superfície vermelha, branca, azul*) também está ocupada por um parente químico próximo de ABT-737, chamado de composto 1 (*figura em bastão verde*, *quarto painel*). No segundo painel, observam-se os efeitos de ABT-737 sobre o crescimento de um xenoinxerto de carcinoma humano pulmonar de células pequenas (SCLC). A barra preta indica a janela de tempo durante a qual ABT-737 foi empregado. Não parece que a droga induz apoptose por si só, mas, em vez disso, torna as células cancerosas vulneráveis a apoptose induzida por outros agentes. (A, a partir de L.T. Vassilev, B.T. Vu, B. Graves et al., *Science* 303:844-848, 2004; B, a partir de M. Leone, D. Zhai, S. Sareth et al., *Cancer Res.* 63:8118-8121, 2003; C, esquerda, a partir de K.H. Emami, C. Nguyen, H. Ma et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:12682-12687, 2004; C, direita, a partir de H. Ma, C. Nguyen, K.S. Lee e M. Kahn, *Oncogene* 24:3619-3631, 2005; D, a partir de T. Oltsersdorf, S.W. Elmore, A.R. Shoemaker et al., *Nature* 435:677-681, 2005.)

ficam para tirosinas cinases, sendo estas últimas as principais atuantes em vários tipos de câncer humano.

Para alguns pesquisadores do câncer, essa multiplicidade de alvos de câncer potencialmente promissores para o desenvolvimento de drogas representa um embaraço de riquezas. Entretanto, para os químicos farmacêuticos, números como esses criam um pesadelo. Como quase todas as proteína cinases são evolutivamente relacionadas umas com as outras (Figuras 16.12 e 16.13A), as suas fendas catalíticas são muito similares estruturalmente. A similaridade é até mesmo mais notável entre as fendas das tirosinas cinases mais intimamente relacionadas (Figura 16.13B), que estão envolvidas na patogênese do câncer. Como alguém poderia desenvolver agentes que afetam as ações de certas cinases associadas ao câncer, enquanto deixam intocadas as cinases necessárias para a proliferação normal das células e sua sobrevivência? O desenho racional de drogas e a triagem em larga escala (HTS), ambos descritos anteriormente, tentam endereçar essas questões.

Figura 16.12 (à esquerda) O cinoma humano. Como ilustrado aqui, a grande maioria das proteínas cinases das células humanas, incluindo serina/treonina e tirosina cinases, compartilham similaridades estruturais substanciais, indicando que todas elas descendem de uma proteína cinase primitiva que existiu muito antes da radiação das formas de vida eucarióticas. As serina/treonina e tirosina cinases divergiram umas das outras relativamente cedo e se diversificaram, além disso, durante os aproximadamente 10^9 anos passados.

Ao todo, a sequência do genoma humano revela 518 genes distintos que codificam para proteínas cinases, que, como grupo, têm sido chamados de "cinoma humano". Desses, 90 fosforilam resíduos de tirosina, enquanto o restante fosforila os resíduos de serina ou treonina de proteínas substrato. Todas as tirosina cinases (TKs) e 318 das serina/treonina cinases mostram uma relação estrutural clara umas com as outras e podem ser arranjadas em uma árvore evolutiva que descreve como elas devem ter evoluído de uma para outra por repetidas duplicações gênicas seguidas pela diversificação. (Um pequeno número de proteínas cinases "atípicas" (*não-mostradas*)

parece representar invenções evolucionárias independentes.) As origens compartilhadas das cinases localizadas nessa árvore ditam que várias dessas enzimas são estruturalmente similares umas com as outras, o que complica a criação de drogas que interferem seletivamente em apenas poucos membros dessa grande família de enzimas.

As TKs (*esquerda, a cima*) representam invenções evolucionárias relativamente recentes, à medida que elas estão ausentes nos procariotos e estão presentes em apenas números muito pequenos (p. ex., três) no genoma de protozoários eucariotos unicelulares sequenciados até agora. A sua grande diversificação e especialização parece ter sido crítica para a evolução de metazoa anatomicamente complexos. Os agrupamentos restantes nessa árvore são TKL, semelhantes à tirosina cinase; STE, homólogos de leveduras estéreis 7, 11 e 20 cinases; CK1, caseína cinase-1; AGC, membros da família das proteínas cinases A, cinases G e cinases C; CAMK, proteínas cinases dependentes de cálcio/calmodulina; e CMGC, contendo famílias CDK, MAPK, GSK-3 e CLK. (Cortesia de Cell Signaling Technology, Inc.)

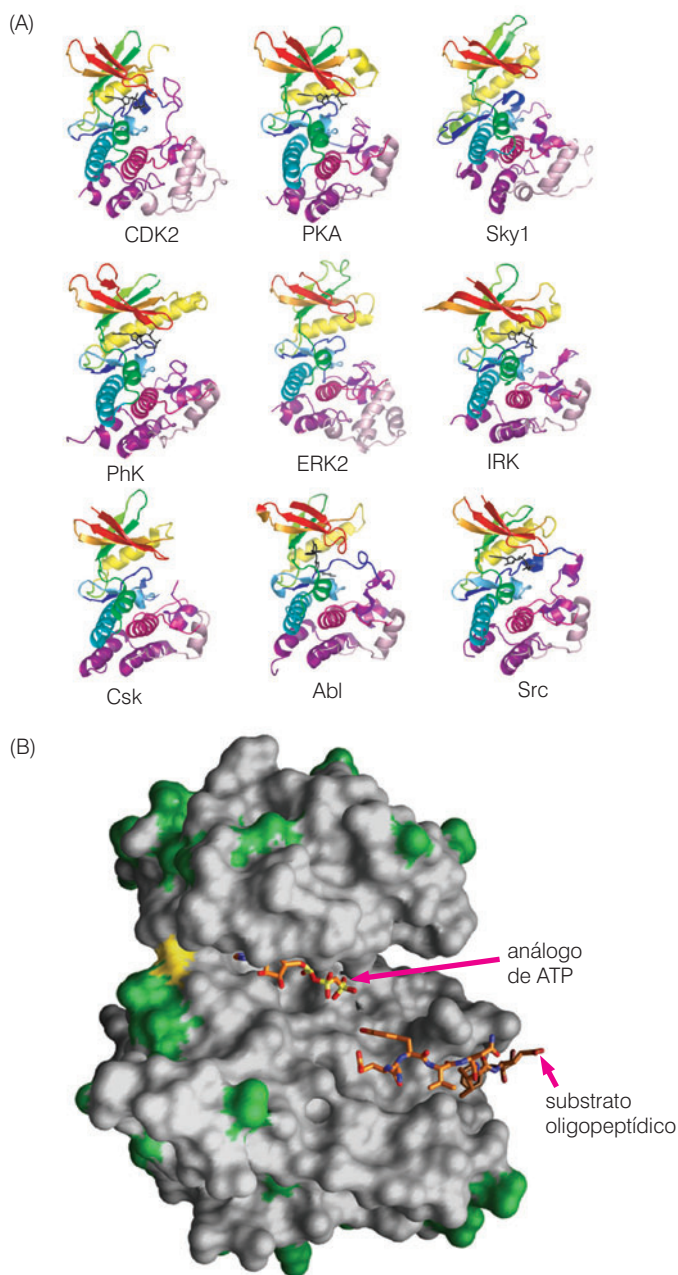
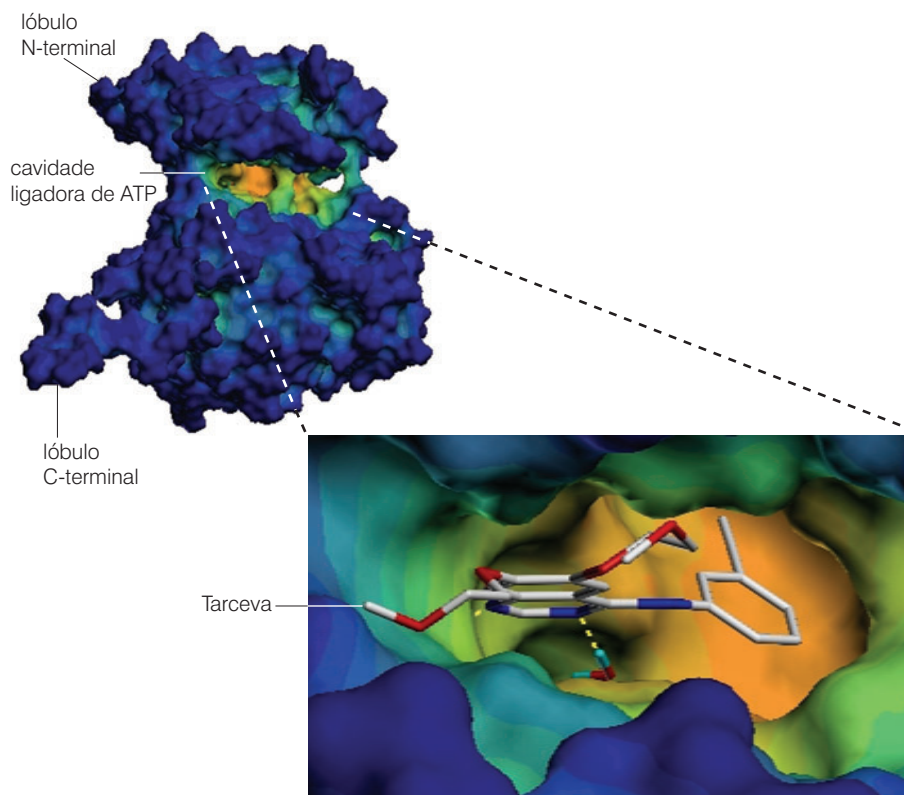


Figura 16.13 Estruturas similares das cinases (A) A dificuldade de produzir um inibidor específico de cinase é sugerida pelas similaridades surpreendentes na estrutura de uma variedade de serina/treonina, assim como de tirosina cinases. Descritos como diagramas em fita estão os domínios cinase de cinco serina/treonina cinases: CDK2 (veja o Capítulo 8), PKA (proteína cinase A cíclica regulada por AMP), Sky1 (cinase específica da proteína SR de levedura envolvida no processamento de RNA do núcleo, PhK (fosforilase cinase envolvida no metabolismo do glicogênio) e ERK2 (cinase regulada extracelularmente da cascata de MAPK, veja a Seção 6.5); assim como quatro domínios tirosina cinase (TK); IRK (cinase receptora de insulina), Csk (cinase Src C-terminal; uma tirosina cinase), Abl (veja a Seção 16.11) e Src (veja o Capítulo 5). Em todos os casos, as fendas catalíticas dessas cinases estão prensadas entre os dois lobos maiores (N e C terminais, *acima e abaixo, respectivamente*) dessas proteínas. (B) Um exemplo extremo das similaridades estruturais entre cinases relacionadas está ilustrado por este diagrama de superfície no qual as fendas catalíticas e os resíduos de aminoácidos adjacentes aos domínios de tirosina cinase do receptor de insulina (IR; ver o IRK do painel A) e do receptor para o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1R) são comparados. Resíduos de aminoácidos idênticos estão em cinza, enquanto os não-similares estão em verde. Isso mostra o quão similar as regiões catalíticas dos dois domínios TK são e explica por que tem sido tão difícil encontrar inibidores de um receptor de tirosina cinase que não afete o outro. Uma treonina no peptídeo que liga os dois lobos das cinases está mostrada em amarelo, enquanto figuras em bastão (*cor de laranja, azul, vermelho, amarelo*) de um análogo de ATP (*esquerda*) e um substrato oligopeptídico (*direita*) também são mostradas. Quase todas as drogas antagonistas de TK se ligam aos sítios de ligação ao ATP das cinases que elas inibem. (A, cortesia de N.M. Haste, S.S. Taylor and the Protein Kinase Resource; B, a partir de S. Favelyukis, J.H. Till, S.R. Hubbard and W.T. Miller, *Nat. Struct. Biol.* 8:1058-1063, 2001.)

Figura 16.14 Tarceva e a inibição do domínio da cinase receptora de EGF Este modelo de espaço preenchido da fenda catalítica do domínio tirosina cinase (TK) do receptor EGF, obtido por cristalografia de raios X, mostra como a droga Tarceva (*figura em bastão*) se encaixa confortavelmente dentro da cavidade ligadora de ATP da fenda e, assim, inibe a sinalização pelo receptor. A complementaridade tridimensional entre droga e proteína-alvo é necessária para a ligação da droga, mas não é suficiente, uma vez que a ligação específica, amplamente alcançada pela formação de pontes de hidrogênio (*não-mostradas*), deve ocorrer entre a molécula de droga e os aminoácidos que revestem o bolsão de ligação da droga (veja, por exemplo, a Figura 16.10C). Uma molécula de água (*no fundo, abaixo*) que está ligada por hidrogênio à molécula de Tarceva também está mostrada. (Cortesia de C. Sambrook-Smith and A. Castelanho, OSI Pharmaceuticals Inc.; ver também J. Stamos, M.X. Sliwkowski and C. Eigenbrot, *J. Biol. Chem.* 277: 46265-46272, 2002.)



16.5 Químicos farmacêuticos podem gerar e explorar as propriedades bioquímicas de um amplo arranjo de drogas em potencial

A ideologia de “desenho racional de drogas”, como é freqüentemente chamada, adota as noções que (1) as drogas deveriam ter como alvo proteínas específicas que sabidamente têm um mal funcionamento dentro das células, contribuindo, assim, para um estado de doença; (2) a candidatura dessas proteínas, como alvos atrativos para intervenção terapêutica, deveria ser também determinada pelo seu potencial para o desenvolvimento de drogas predito; e (3) as estruturas moleculares detalhadas de tais proteínas-alvo deveriam informar o desenho das estruturas químicas das drogas que serão desenvolvidas. Mais especificamente, devem ser sintetizadas espécies químicas cujas estruturas tridimensionais detalhadas (i. e., cuja *estereo-química*) permitam que elas se encaixem, de um modo chave-fechadura, em bolsões específicos ou sítios dentro das proteínas muito maiores do que aquelas que serão supostamente atacadas ou desativadas (veja, por exemplo, a Figura 16.14).

Em princípio, o conhecimento da estrutura detalhada de uma cavidade potencial que se liga a drogas em uma proteína-alvo deveria permitir que um químico orgânico perito desenhasse e sintetizasse uma molécula que se encaixe de forma confortável dentro dessa cavidade e forme múltiplas ligações não-covalentes com os aminoácidos que revestem as suas paredes. Entretanto, essa rota puramente teórica para o desenho de uma nova estrutura de droga não gerou, na prática, vários produtos úteis. Por essa razão, a atual descoberta de drogas depende de modos mais empíricos de encontrar estruturas moleculares úteis.

O maior desafio com relação ao desenvolvimento de drogas anticâncer é prever as respostas *clínicas* (i. e., paciente) a partir da pesquisa *pré-clínica* conduzida na bancada do laboratório e em animais. Imagine, por exemplo, que a triagem em larga escala tenha gerado uma molécula de droga que inibe a atividade de uma proteína-alvo em células vivas, fazendo isso a concentrações micromolares de 10 ou 100 (i. e., concentrações nessa faixa são necessárias para inibir 50% da atividade da proteína-alvo). O desenvolvimento adicional dessa droga em particular

se torna irreal, dada a quantidade massiva desse agente que precisaria ser liberada para dentro do organismo do paciente com o objetivo de obter um efeito terapêutico. As propriedades químicas dessas espécies moleculares podem ou não permitir a *derivatização* (a síntese de derivados modificados desse composto) que gera uma molécula com uma potência na faixa de concentração nanomolar.

Os testes pré-clínicos que seguem envolvem medidas dos efeitos *relativos* das drogas sobre o seu alvo pretendido comparadas com seus efeitos **não-específicos** sobre outras proteínas similares na célula. O objetivo é determinar se a droga atua seletivamente inibindo a proteína-alvo em concentrações de droga que estão substancialmente abaixo (10 a 100 vezes) daquelas que afetam outras proteínas similares na célula (Figura 16.15). (Na verdade, dadas as 20 mil ou mais estruturas de proteínas distintas presentes nas células de mamíferos, essas medidas não evitam possíveis efeitos sobre proteínas não-relacionadas estruturalmente que poderiam, por casualidade, ser afetadas por um agente em desenvolvimento.)

No caso dos inibidores de tirosina cinase, que são atualmente o foco de muitos desenvolvimentos de drogas, esforços na identificação de todas as cinases que poderiam ser afetadas por uma droga têm, até recentemente, envolvido ensaios com apenas uma pequena proporção de um amplo grupo de proteínas cinases sabidamente presentes nas células humanas. Como consequência, certos efeitos não-específicos provavelmente enganaram os desenvolvedores de drogas. Isso começou a mudar com o evento da triagem mais sistemática de uma porção muito mais ampla de cinases que poderiam ser afetadas por esses inibidores.

Por exemplo, uma empresa de biotecnologia desenvolveu um ensaio (Figura 16.16) para medir as afinidades de ligação de uma droga-teste para 156 diferentes cinases que estão localizadas em várias ramificações da árvore cinoma (veja a Figura 16.12). Observou-se que, de fato, dois inibidores de receptores EGF – que serão discutidos em maiores detalhes mais adiante –, Iressa e Tarceva, se ligam preferencialmente à tirosina cinase de EGF-R, ao passo que está confirmada a capacidade da estaurosporina, a qual se acredita inibir um amplo espectro de proteínas cinases de todos os tipos, de exibir uma ampla capacidade de ligação a cinases. (Foi observado que a *afinidade de ligação* de uma droga-teste para uma cinase, como medida nesse ensaio, prediz a capacidade dessa droga em *inibir a atividade* da cinase.)

Como veremos a seguir, a descoberta de atividades não-específicas de uma droga, o que é possibilitado por triagens como essa, é atualmente útil de duas formas. (1) Ela pode explicar a toxicidade de uma droga – efeitos colaterais indesejados de uma droga sobre tecidos diferentes daqueles do tumor-alvo. (2) Ela pode revelar novas aplicações clínicas para a droga, uma vez que a droga pode vir a inibir uma enzima, como uma cinase, que é ativa em um tipo de tumor que não era alvo durante o desenvolvimento inicial da droga.

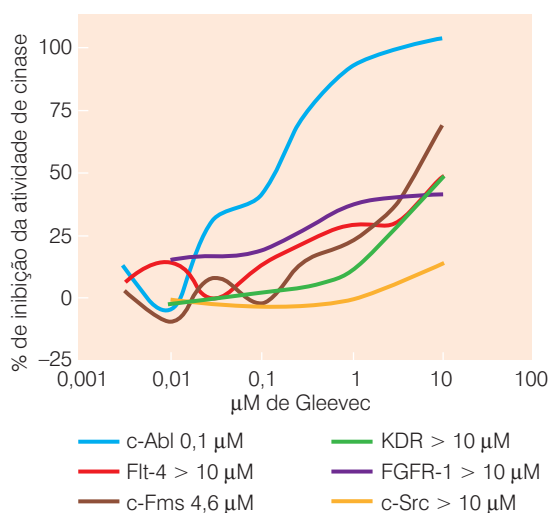


Figura 16.15 Curvas de dose-resposta do Gleevec A capacidade de inibir a proteína-alvo sem afetar outras proteínas celulares relacionadas é crítica para o sucesso da terapia, tornando possível respostas terapêuticas sem os efeitos colaterais indesejados de toxicidade. Aqui vemos as respostas de um grupo de seis enzimas tirosina cinase (TK) à droga Gleevec (veja a Figura 16.10). Em todos os casos, a atividade da cinase das enzimas purificadas foi medida. Note que o gráfico foi construído usando o log da concentração de Gleevec na abscissa, enquanto a porcentagem de inibição da atividade catalítica está inserida linearmente na ordenada. Em uma concentração de cerca de 0,1 μM, por volta de 50% da atividade da enzima c-Abl foi inibida, enquanto uma inibição comparável da TK c-Fms apenas ocorreu a uma concentração tão alta quanto 4,6 μM. Sob essas condições, a TK c-Src foi duramente inibida. (Cortesia de E. Buchdunger, Novartis Pharmaceuticals.)

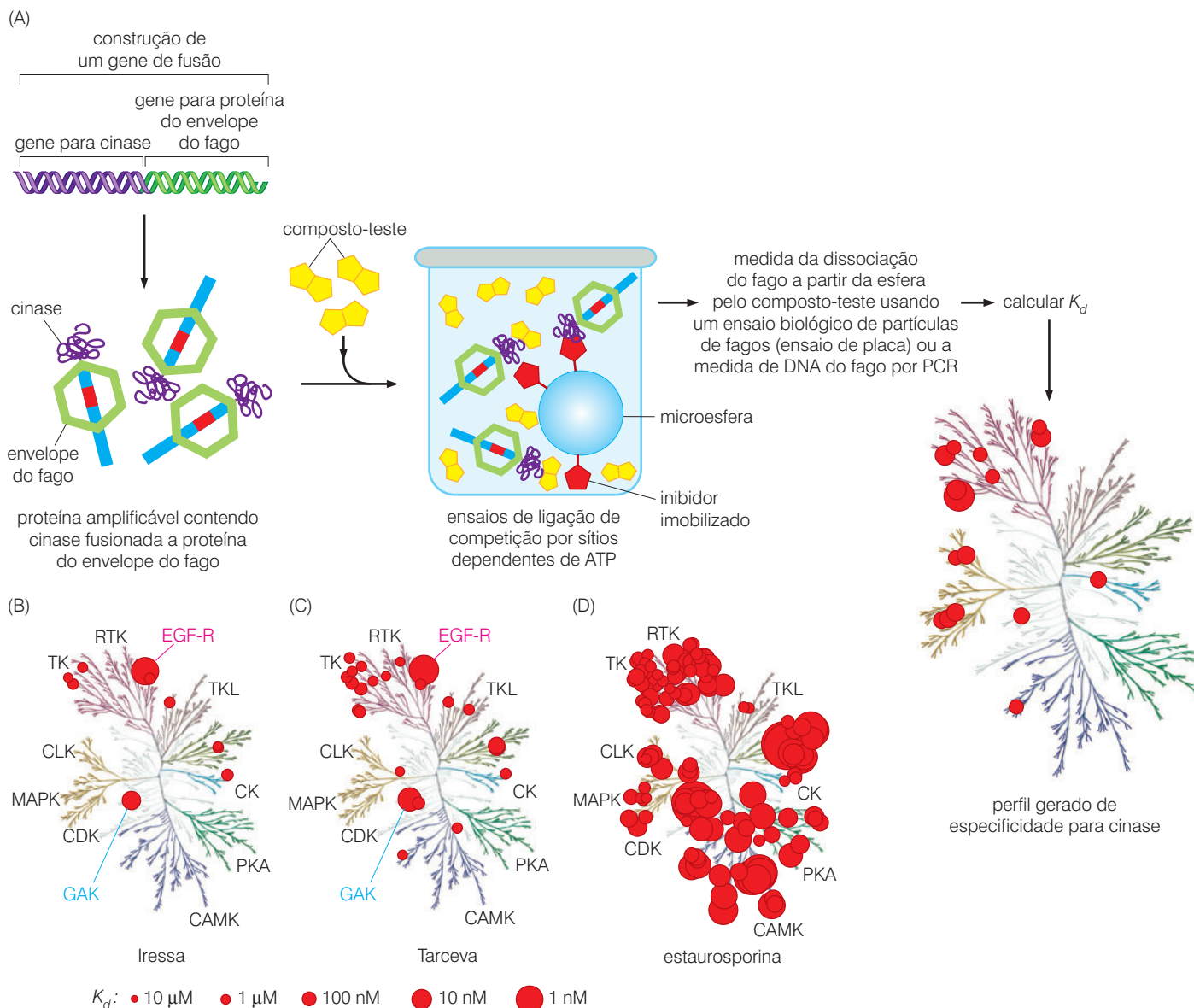


Figura 16.16 Efeitos dos inibidores de cinase sobre um amplo espectro de proteínas cinases. As respostas individuais a vários inibidores de cinases de um arranjo de 156 tirosina e serina/treonina cinases distintas foram testadas pela medição das afinidades de ligação de cada inibidor com cada uma dessas cinases. Este teste depende do fato de que quase todos os inibidores de cinases se ligam aos sítios de ligação ao ATP das enzimas-alvo. (A) Um cDNA que codifica para o domínio cinase de uma proteína é clonado em vetor bacteriófago de maneira que algumas proteínas (verde) do capsídeo do fago (envelope) sejam sintetizadas como proteínas de fusão com a cinase (roxo). Um análogo de ATP que sabidamente se liga aos sítios de ligação a ATP de várias cinases (vermelho) é então imobilizado por uma ligação a microesferas (azul-claro). Isso permite que partículas de fagos se liguem via proteínas de fusão nos seus capsídeos ao análogo de ATP sobre as esferas. O ensaio então mede a capacidade de um componente do teste (p. ex., um candidato a inibidor de tirosina cinase, amarelo) para competir com o inibidor imobilizado (vermelho), bloqueando assim a associação do fago à esfera. A redução na ligação do fago às esferas, como revelado por várias partículas de fagos liberadas a partir das esferas (usando um ensaio de placa de fago ou uma reação em cadeia da polimerase para o DNA de fago) então indica a afinidade de ligação para o composto-teste com a cinase presente na proteína de fusão,

como representado pela sua constante de dissociação, K_d , isto é, a concentração na qual 50% do fago são dissociados das esferas. Nos painéis restantes, cada cinase que mostrou um K_d menor do que 1 μM está indicada por um círculo vermelho cujo diâmetro varia inversamente com o K_d (constante de afinidade da ligação) e cuja posição está indicada pela localização da cinase sobre a árvore cinoma (veja a Figura 16.12). Os efeitos de dois inibidores do receptor EGF (EGF-R) que já foram licenciados para uso clínico, Iressa e Tarceva, são analisados nos painéis (B) e (C), respectivamente. Ambos, de modo tranquilizador, mostram maior especificidade para o EGF-R do que para as outras 155 cinases testadas. Entretanto, Iressa também se liga a GAK (cinase associada à ciclina G; veja a Barra lateral 5.3) a uma concentração cerca de 10 vezes maior, enquanto Tarceva afeta GAK a uma concentração ainda mais baixa, apenas mais alta do que a necessária para inibir o próprio EGF-R. (D) Ao contrário, a estaurosporina, um reagente experimental amplamente utilizado conhecido por inibir várias cinases, é vista se ligando a um grande número dessas enzimas, algumas enquanto ele está presente em concentrações subnanomolares. (A, a partir de J.D. Griffin, *Nat. Biotechnol.* 23:308-309, 2005; B, C e D, cortesia de P.R. Zarrinkar and D.J. Lockhart, Ambit Biosciences; ver também M.A. Fabian, W.H. Biggs 3rd, D. K. Treiber et al., *Nat. Biotechnol.* 23:329-336, 2005.)

16.6 Candidatos a drogas devem ser testados em modelos celulares como uma medida inicial da sua utilidade em organismos inteiros

A capacidade demonstrada de uma droga para inibir uma proteína-alvo isolada em solução é normalmente seguida por testes de seus efeitos sobre células em cultura. Tome o caso de Gleevec, o composto (veja a Figura 16.10A) encontrado inicialmente por inibir a atividade de tirosina cinase da proteína de fusão isolada Bcr-Abl; sabia-se que essa proteína era responsável por dirigir a proliferação e sobrevivência das células cancerosas da leucemia mielogênica crônica (CML). Tendo estabelecido seus efeitos sobre a proteína Bcr-Abl isolada (veja a Figura 16.15), os desenvolvedores de drogas puderam então prosseguir para o próximo passo, que envolveu o uso de células em cultura cuja proliferação ou sobrevivência *in vitro* dependia de ações contínuas dessa proteína de fusão.

A Figura 16.17 mostra um exemplo de tal teste baseado em células que foi realizado muito depois do Gleevec ter sido desenvolvido. Esse teste usou as células de uma linhagem de pré-linfócitos B murinos que normalmente depende da presença de interleucina-3 (IL-3) no seu meio de cultura para sua sobrevivência e proliferação *in vitro*. Essas células poderiam tornar-se independentes de IL-3 se uma oncoproteína Bcr-Abl fosse expressada ectopicamente nelas. As células modificadas foram então cultivadas na ausência de IL-3 (tornado-as totalmente dependentes do disparo contínuo de Bcr-Abl) e expostas a várias drogas que eram candidatas a antagonistas da oncoproteína Bcr-Abl; a proliferação e/ou sobrevivência dessas células foi então medida (Figura 16.17B).

Testes baseados em células, como esse, são planejados para determinar se a droga que está sendo examinada induz apoptose nas células tratadas, ou citostase (i. e., uma parada na proliferação celular), ou não tem efeito algum. E se a droga evoca uma resposta desejada, ela o faz a uma concentração razoavelmente baixa?

O resultado desses testes baseados em células raramente é óbvio antecipadamente. Vários compostos que são muito hidrofóbicos podem ser excluídos desses testes a partir do início porque são pouco solúveis e, assim, não podem ser colocados em células em cultura em concentrações significativas. Seus parentes químicos mais hidrofílicos podem ser altamente solúveis e podem funcionar bem na proteína Bcr-Abl purificada, mas podem não ser prontamente transportados pelas membranas plasmáticas das células; essas espécies químicas provavelmente não serão úteis, simplesmente por não poderem se acumular dentro das células a concentrações que permitiriam que fossem efetivas.

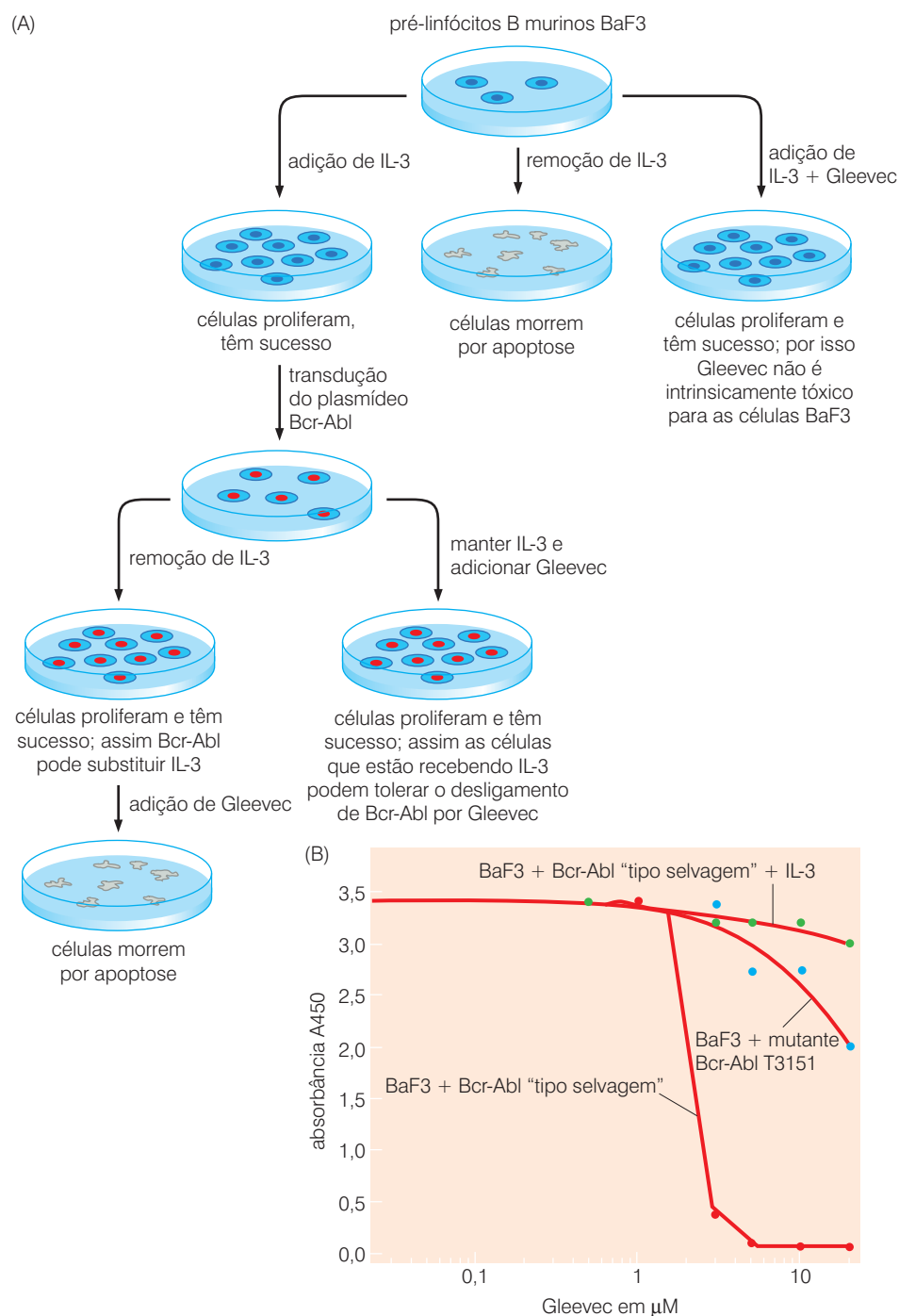
Imagine que esses obstáculos foram superados com sucesso e que a proliferação das células dependentes de Bcr-Abl é, na verdade, inibida a concentrações nanomolares de um candidato a agente terapêutico. O fato de que a droga candidata atua nessas células não exclui a possibilidade de que ela também afete dúzias de outras cinases nessas e em outras células, algumas das quais podem ser essenciais para o metabolismo normal da célula – a propriedade de **seletividade** biológica. (A sua seletividade *bioquímica* provavelmente foi determinada previamente por testes como aqueles ilustrados na Figura 16.15.)

Assim, logo a seguir, se tornou necessário determinar se as células cancerosas cujo crescimento é dirigido por outras tirosinas cinases são igualmente sensíveis às ações de um agente anti-Bcr-Abl identificado como o Gleevec. E como células totalmente normais cultivadas são afetadas por uma droga candidata como o Gleevec? Com sorte, se pode começar a ver um alto **índice terapêutico** emergir; por exemplo, células dependentes de Bcr-Abl podem ser mortas por concentrações da droga que têm um efeito pouco perceptível em células comparáveis crescidas na presença de IL-3 ou em uma variedade de outras células cancerosas cujo crescimento é dirigido por outras oncoproteínas tirosina cinase. Isso proverá esperança de que, *in vivo*, a droga poderá perturbar o tumor sem ter efeitos colaterais não-aceitáveis em tecidos normais. Bons resultados nesses testes encorajarão os desenvolvedores de drogas a proceder para as próximas etapas, nas quais os efeitos biológicos das drogas em nível celular e tecidual são estimados *in vivo*, como aprenderemos a seguir.

16.7 Estudos sobre a ação de drogas em animais de laboratório são parte essencial dos testes pré-clínicos

Figura 16.17 Teste do Gleevec em cultura de células (A) Células BaF3, uma linhagem de pré-linfócitos B murinos, são normalmente dependentes da adição de interleucina-3 (IL-3) para sua proliferação e sobrevivência (*acima, à esquerda*). Quando Gleevec é adicionado juntamente com IL-3, essas células continuam a ter sucesso (*acima, à direita*), indicando que o mecanismo de sobrevivência baseado em IL-3 não é sensível à inibição por Gleevec. Um plasmídeo de expressão especificando a oncoproteína Bcr-Abl pode ser introduzido nessas células, e, sob tais condições, as células BaF3 continuam a proliferar, mesmo depois que IL-3 é retirada (*lado esquerdo*), indicando que Bcr-Abl pode substituir IL-3 e sustentar essas células por si só. Entretanto, como essas células agora são dependentes de Bcr-Abl para sua sobrevivência, a adição de Gleevec em doses que inibem a cinase Abl as levará à morte (*mais abaixo, à esquerda*), enquanto a adição de Gleevec às células expressando Bcr-Abl que continuam a receber IL-3 não afetam a sua sobrevivência (indicando que Gleevec não é tóxico para as células BaF3 que expressam Bcr-Abl enquanto elas continuam a receber a estimulação de IL-3). Portanto, na ausência de IL-3, as células BaF3 expressando Bcr-Abl podem servir como indicadores altamente sensíveis e específicos das ações de Gleevec e de drogas que atuam de forma similar na oncoproteína Bcr-Abl. (B) A informação no painel A pode ser utilizada para desenvolver um sistema de ensaio, no qual o número de células BaF3 que sobrevivem após certos tratamentos é indicado pela densidade óptica das suspensões de células BaF3 (*ordenada*). Na presença de IL-3, Gleevec quase não tem efeito sobre a sobrevivência das células BaF3 se a oncoproteína Bcr-Abl estiver ou não sendo expressa nas células BaF3 (*pontos em verde*). Na ausência de IL-3, entretanto, a sobrevivência de células expressando Bcr-Abl está fortemente anulada acima de cerca de 2 μM de concentração do Gleevec (*pontos em vermelho*). Se, em vez da proteína Bcr-Abl do "tipo selvagem", clonada a partir de células de pacientes de CML no início do tratamento com Gleevec, uma versão mutante altamente resistente a drogas de Bcr-Abl (chamada de T3151) que surgiu em um paciente de CML durante o curso do tratamento com Gleevec for expressa nas células BaF3, concentrações muito altas da droga serão necessárias para matar essas células (*pontos em azul*); esta última curva é medida, mais uma vez, na ausência de IL-3 no meio de crescimento. (Cortesia de M. Azam and G.Q. Daley.)

Uma vez que um candidato a agente antitumoral tenha mostrado ter efeitos mortais potentes sobre células cancerosas em cultura *in vitro*, o desenvolvimento de drogas inevitavelmente move-se para a próxima etapa – testar se ela irá matar células cancerosas em proliferação dentro de massas tumorais *in vivo*. Idealmente, o comportamento *in vitro* de uma droga deveria prever as suas ações *in vivo*.



Nesse ponto, complicações adicionais surgem. Uma delas é sugerida pelos resultados experimentais que foram encontrados na Seção 13.10. Naquela seção, vimos que a sensibilidade dos tumores à radiação pode ser determinada pela radiosensibilidade das células endoteliais na sua vasculatura, em vez de pelas respostas das células neoplásicas nessas massas; algumas drogas podem agir similarmente, afetando as células de suporte do estroma de um tumor (que não são estudadas *in vitro*) em vez de as próprias células cancerosas. Independentemente disso, células do estroma podem prover certos tipos de sinais de sobrevivência antiapoptóticos, como IGF-1, que não estão disponíveis em quantidades comparáveis às células cancerosas em cultura. Em um sentido mais geral, as complexidades da biologia dos tumores criadas pelas interações heterotípicas com o estroma associado a tumor frequentemente ditam que as respostas a drogas, de populações puras de células cancerosas proliferando *in vitro*, falham em predizer suas respostas dentro de tumores em crescimento *in vivo*.

Como células de roedores e de humanos diferem tanto, substancialmente, na sua biologia (Seção 11.12), os testes *in vitro* de drogas candidatas anticâncer envolvem, quase sempre, células cancerosas humanas (em vez de murinas) crescidas em camundongos hospedeiros. A suposição é que os xenoinxertos de tumores humanos formados em camundongos imunodeprimidos terão um comportamento semelhante ao de tumores encontrados por oncologistas em pacientes humanos.

Mais uma vez, existem complicações muito desafiadoras. As células tumorais humanas que são usadas para formar esses xenoinxertos são propagadas como linhagens de células tumorais – células cancerosas que foram propagadas em cultura como populações puras durante vários anos, frequentemente, décadas. Um grupo de 60 dessas linhagens de células humanas cancerosas foi estabelecido pelo National Cancer Institute como reagentes-padrão a serem usados nos Estados Unidos para medir a eficácia de candidatos a agentes anticâncer. Várias dessas linhagens celulares não são exemplos de neoplasmas encontrados rotineiramente na clínica do câncer, pois elas derivam de tumores humanos particularmente agressivos que geraram células que são especialmente adaptáveis à propagação em cultura de tecido (veja, por exemplo, a Figura 16.18). Outras linhagens celulares de câncer têm evoluído, quase que inevitavelmente, em cultura muito além das células ancestrais que foram originalmente removidas a partir dos tumores humanos atuais; na verdade, as células em tais linhagens têm sido selecionadas pela ótima proliferação sob condições *in vitro*, que diferem de maneira drástica daquelas nos tecidos vivos.

Esses fatos ajudam a explicar por que modelos de xenoinxertos de tumores humanos não predizem, relativamente, as respostas dos tumores atuais produzidos por pacientes na clínica do câncer. Na verdade, em alguns casos, é questionável se as células cancerosas que são oriundas de, por exemplo, um carcinoma pancreático, continuam a refletir comportamento pancreático ou se elas foram contaminadas inadvertidamente por células de carcinoma de cólon ou mama em algum ponto durante as últimas décadas das passagens *in vitro* em um ou outro laboratório. Ainda, esses modelos altamente imperfeitos de xenoinxertos são os melhores reagentes disponíveis e provavelmente não serão substituídos no futuro próximo por modelos animais melhorados de câncer humano.

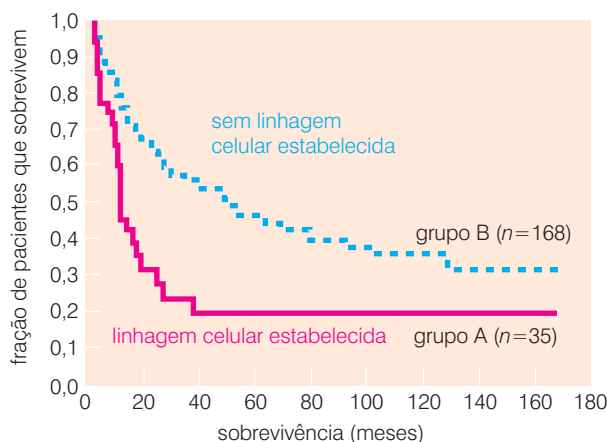
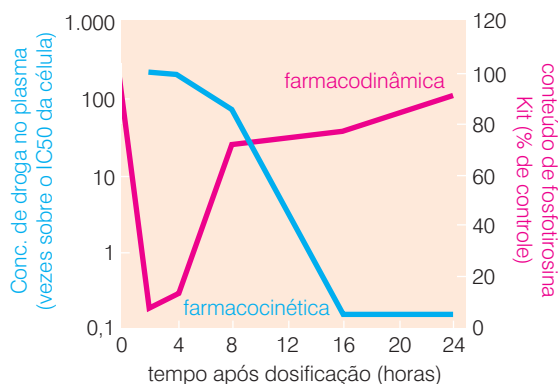


Figura 16.18 Linhagens celulares de câncer como representantes de tumores humanos. Vários pesquisadores têm se esforçado para criar linhagens celulares de câncer pela extração de células de tumores humanos e pela sua adaptação a cultura. A sua experiência é que apenas as células cancerosas mais malignas possam ser propagadas *in vitro*, gerando linhagens de células cancerosas. Essa noção foi finalmente testada sistematicamente em um estudo de 12 anos, no qual as células de carcinoma de esôfago de 203 pacientes foram introduzidas em cultura. Dessas, apenas 35 linhagens celulares (a partir de cerca de 17% dos tumores) se tornaram estabelecidas em cultura. Os pacientes cujos tumores estavam nesse grupo (grupo A) experimentaram uma progressão clínica muito pior (linha vermelha) do que aqueles cujas células falharam na adaptação a cultura (grupo B; linha azul). Isso ilustra graficamente por que os xenoinxertos tumorais produzidos a partir de linhagens celulares de câncer estabelecidas normalmente falham em resumir as propriedades dos tumores tipicamente encontrados na clínica de câncer (uma vez que as linhagens de células cancerosas normalmente derivam de tumores na extremidade final do espectro – o subgrupo mais agressivo). (A partir de Y. Shimada, M. Maeda, G. Watanabe et al., *Clin. Cancer Res.* 9:243-249, 2003.)

Figura 16.19 Farmacocinética e farmacodinâmica do Gleevec. A farmacocinética de uma droga representa a cinética do seu acúmulo no plasma e o seu desaparecimento deste, que, por sua vez, acredita-se prover uma boa indicação das concentrações da droga que as células tumorais experimentam em um animal de laboratório ou um paciente sob terapia. O nível plasmático da droga Gleevec, representado em uma escala logarítmica (*ordenada esquerda*), flutua dramaticamente após a injeção da droga em um camundongo (*curva azul*). A sua concentração está indicada aqui como um múltiplo da concentração da droga conhecida por inibir o disparo da tirosina cinase do receptor Kit em 50% (i. e., o IC_{50} deste agente). (O domínio tirosina cinase do receptor do fator de crescimento Kit também é um alvo de inibição por Gleevec.) Como visto aqui, a quantidade de fosfotirosina associada ao receptor Kit (uma reflexão da atividade da tirosina cinase Kit) expressado por células de leucemia de mastócitos humanos enxertadas (*curva vermelha*), que foi inicialmente determinada como 100%, é reduzida para <<1% dos níveis preexistentes dentro de uma hora depois da injeção da droga, mas se liga novamente dentro de oito horas à medida que a concentração da droga diminui no plasma. (Cortesia de D.L. Emerson, OSI Pharmaceuticals Inc.)



A **farmacocinética** (PK) de uma droga representa um determinante-chave da sua eficácia *in vivo*: A droga se acumula em níveis significativos no plasma ou nos tecidos por um período extenso? Ou ela está presente no corpo apenas transientemente, sendo excretada pelos rins dentro de minutos depois de entrar na circulação? Ela é resistente à degradação rápida ou alguns sistemas de metabolização de drogas, como o citocromo P-450s (Cyps) que encontramos no Capítulo 12, convertem rapidamente a droga em uma espécie molecular inócua (Figura 16.19)? (Um parâmetro farmacocinético chave que é freqüentemente medido é a “área abaixo da curva”, ou AUC, calculada pela integração da concentração de uma droga no plasma em função do tempo; acredita-se que a AUC reflita a dose da droga cumulativa experimentada pelas células em um tumor.) E ela pode ser preferencialmente administrada oralmente em vez de por injeção?

Animais de laboratório fornecem alguma indicação grosseira da farmacocinética da droga, mas de nenhum modo são preditores acurados de como os humanos metabolizam e excretam vários agentes. Além disso, como lemos anteriormente (Barra lateral 12.5), a velocidade na qual vários compostos, incluindo drogas, são metabolizados ou excretados pode até variar dramaticamente de uma pessoa para outra (p. ex., veja a Figura 16.20). (Em algumas companhias farmacêuticas, a farmacocinética de compostos candidatos pode ser medida até mesmo *antes* de quaisquer testes de eficácia terapêutica contra tumores xenoenxertados; aqueles mostrando uma farmacocinética pobre em animais de laboratório são freqüentemente eliminados de testes futuros. O descarte de tais drogas pode ser ocasionalmente prematuro, dadas as grandes diferenças entre as velocidades de metabolismo e excreção de drogas entre roedores e humanos.)

De fato, a Figura 16.19 revela um segundo atributo de uma droga – a sua **farmacodinâmica** (PD) – nesse caso, aquela do Gleevec. A farmacodinâmica estima a habilidade de uma droga em afetar uma função bioquímica alvo em um tumor sob tratamento. Na PD apresentada nessa figura, como é de prática, um **marcador substituto** da função Bcr-Abl alvo foi medido – o comportamento do receptor Kit. Como leremos com maiores detalhes, Kit é uma das várias tirosinas cinases afetadas por Gleevec, e as suas respostas à droga presumivelmente se comparam àquelas de Bcr-Abl. A Figura 16.19 revela que a atividade de Kit nesse experimento foi inibida apenas brevemente no momento em que a concentração mais alta da droga estava presente na circulação. Uma inibição transiente como essa – apenas uma fração de um ciclo celular – em geral é insuficiente para se obter uma resposta biológica importante, como a morte das células tumorais.

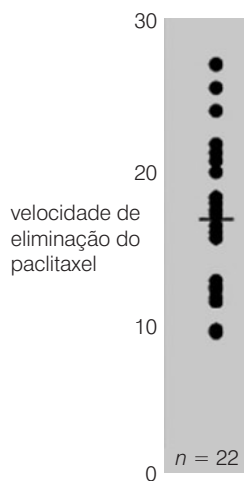


Figura 16.20 Variabilidade entre indivíduos na eliminação das drogas Paclitaxel é uma droga quimioterapêutica usada para tratar inúmeras malignidades; ela funciona estabilizando microtúbulos, interferindo, assim, na progressão das células pela fase M. Como visto aqui, neste estudo com 22 pacientes com câncer de ovário, as velocidades relativas de eliminação dessa droga a partir do plasma após a injeção inicial variou acima de um fator de 3. Essas taxas podem ser influenciadas por mudanças na velocidade do metabolismo por enzimas como a citocromo c e pela excreção nos rins. (A partir de M. Nakajima, Y. Fujiki, S. Kyo et al., *J. Clin. Pharm.* 45:674-682, 2005.)

Durante o curso dos testes em animais, podem vir à tona informações sobre os efeitos colaterais tóxicos que a droga produz em organismos vivos. Elas representam a maldição de quase todos os tratamentos de câncer existentes. Bastante frequentes, vários sistemas de órgãos normais, incluindo fígado, rins, trato gastrointestinal e sistema hematopoiético, mostram os efeitos tóxicos de uma droga quando ela é usada nas concentrações necessárias para matar as células tumorais. Essas toxicidades são raramente preditas por testes de cultura de tecidos *in vitro*, e as toxicidades detectadas em animais de laboratório, incluindo cães, macacos, camundongos e ratos, podem ou não ser preditivas das respostas humanas.

Tais observações direcionam a nossa atenção, mais uma vez, para o índice terapêutico de um agente – a eficácia com a qual ele afeta os tecidos cancerosos comparada com seus efeitos tóxicos nos tecidos normais. Claramente, os tratamentos ideais de câncer deveriam ter altos índices terapêuticos, expressando destruição sobre as células cancerosas enquanto deixam os tecidos normais relativamente intactos. O obstáculo fundamental para alcançar tal seletividade é sugerido pelo fato de que a vasta maioria dos aproximadamente 20 mil genes expressados nas células cancerosas também está sendo expressada pelas suas contrapartes normais.

A falha dos modelos animais em prever os efeitos colaterais tóxicos de uma droga em humanos cria sérios problemas. Os aproximadamente 80 milhões de anos de evolução independente que nos separam dos nossos primos roedores levaram a diferenças substanciais no metabolismo; podemos reagir a certas drogas de forma muito diferente dos camundongos ou ratos, ou até mesmo dos mais proximamente relacionados macacos do velho mundo, que podem finalmente ser expostos a uma droga candidata com o objetivo de obter uma predição mais acurada da toxicidade em humanos. No momento em que uma droga passa esses vários testes sem erguer muitas bandeiras de alerta, ela pode ser promovida a candidata para ser testada em humanos.

16.8 Drogas candidatas promissoras devem ser submetidas a testes clínicos rigorosos e abrangentes nos testes de Fase I em humanos

As discussões anteriores explicam por que os primeiros testes de verdade sobre a tolerabilidade de uma droga normalmente aparecem nas exposições iniciais do paciente; são os chamados testes de Fase I, nos Estados Unidos. Em tais testes, as drogas candidatas são testadas em várias doses, incluindo a dose terapêutica presumida, para estimar os efeitos colaterais tóxicos. A prática normal é começá-los em dosagens da droga que estão bem abaixo do nível de qualquer **toxicidade** observável (p. ex., um décimo da concentração da droga que gerou toxicidade em animais de laboratório) e, então, em uma série de pacientes, aumentar as dosagens até alcançar níveis da droga que comecem a induzir uma toxicidade inaceitável. Esse “escalonamento da dose” gera um valor – a dose máxima tolerante (MDT) – que é então usado para guiar os futuros protocolos de tratamento. Certos efeitos colaterais, como erupções na pele ou náuseas transientes, podem ser toleráveis e não descartam o futuro desenvolvimento da droga, enquanto outros, como diarreia massiva ou depleção da medula óssea, podem ser tão incômodos ou ameaçadoras à vida que levam ao abandono de todo desenvolvimento adicional de uma droga.

Durante os testes de Fase I, medidas farmacocinéticas, como aquelas realizadas previamente em animais, também serão tomadas, com o objetivo de verificar se a droga está alcançando as células tumorais a uma concentração suficiente e durante um período extenso de tempo. Ainda, essas medidas não dão indicação se as células cancerosas estão respondendo de alguma forma – a propriedade da farmacodinâmica. Por exemplo, na Figura 16.21, observamos as respostas farmacodinâmicas a tratamentos com antagonistas de receptores de EGF (que, nesse caso, incluem tanto um anticorpo monoclonal como um inibidor de tirosina cinase de baixo peso molecular). Os oncologistas que se responsabilizaram por esse teste clínico em particular gostariam de obter alguma medida sobre os efeitos de terapias sobre o EGF-R em tumores de pacientes. Para fazer isso, eles escolheram usar, como marcador substituto, os EGF-R de células da pele dos pacientes, que são monitorados com muito maior facilidade, simplesmente coletando pequenas biópsias de pele de pacientes em tratamento.

Como visto na Figura 16.21A, a exposição de pacientes a um inibidor de EGF-R de tirosina cinase resultou em uma forte supressão da sinalização de EGF-R na pele. Além disso, a atividade de MAP cinase, que funciona como um importante transdutor *downstream* da sinalização de EGF-R (Seção 6.5), também foi suprimida, indicando a inibição com sucesso da sinalização mitogênica *downstream*.

Resultados semelhantes foram observados em biópsias coletadas a partir de tumores de pacientes com câncer de cólon, após o tratamento com um anticorpo monoclonal anti-EGF-R (Figura 16.21B). Medidas farmacodinâmicas como essas reasseguram que o tratamento administrado (nesse caso, um anticorpo monoclonal) está alcançando o seu alvo desejado em concentrações suficientes para desligar muito da atividade dele.

De maneira interessante, várias das proteínas transdutoras de sinal que funcionam *downstream* de EGF-R, incluindo Akt/PKB, foram suprimidas apenas de forma mínima no tumor do cólon (Figura 16.21B), indicando que as células tumorais adquiriram meios alternativos para ativar aquelas moléculas sinalizadoras. Portanto, as medidas farmacodinâmicas asseguram que uma pré-condição de sucesso terapêutico – entrega do agente terapêutico para as células e moléculas alvo – foi satisfatória, mas não garante, por si só, que a terapia terá sucesso, já que outros fatores podem frustrá-la.

Quando juntas, as medidas de dose de tolerância máxima (MTD), a farmacocinética (PK) e a farmacodinâmica (PD) definem a **janela terapêutica** – o espectro de concentrações que são mais altas do que as necessárias para obter o efeito terapêutico e mais baixas do que a dose máxima tolerada (Figura 16.21C). Idealmente, a janela terapêutica de uma droga deveria ser ampla de modo a permitir aos clínicos alguma flexibilidade na administração da droga, ajustando a dosagem ao paciente e a condição a ser tratada. À medida que a janela terapêutica se estreita, a probabilidade de a droga candidata se tornar clinicamente útil diminui.

Ocasionalmente, os testes clínicos de Fase I, que em geral são realizados com grupos muito pequenos de pacientes voluntários, que falharam com outras terapias disponíveis, podem revelar algumas respostas favoráveis em termos de regressão tumoral ou paradas de um crescimento maior do tumor, fazendo isso a baixos níveis aceitáveis de toxicidade. Entretanto, mesmo que haja pistas de eficácia clínica, os resultados positivos observados nos testes de Fase I nunca são estatisticamente significativos e, assim, não são considerados como definitivos. Ao contrário, esses testes são, na verdade, realizados para descobrir antecipadamente os níveis de toxicidade e tolerância da dosagem da droga.

16.9 Testes de Fases II e III fornecem indicações creditáveis sobre a eficácia clínica

Baixos níveis aceitáveis de toxicidade em um teste de Fase I encorajarão a testar a eficácia de uma droga candidata em um teste de Fase II, no qual grupos maiores de pacientes com câncer estão envolvidos. Nesse caso, pela primeira vez, decisões críticas devem ser tomadas sobre as **indicações** para inscrever pacientes específicos no teste – isto é, qual tipo de tumor ou qual estágio de progressão do tumor justificará o alistamento de pacientes em um teste como esse?

Algumas vezes, as indicações clínicas são óbvias. Por exemplo, como vimos anteriormente, os efeitos de um agente contra a oncoproteína Bcr-Abl deveriam ser testados em pacientes diagnosticados com leucemia mielógena crônica (CML). Uma outra droga direcionada contra a molécula receptora HER2/Neu deveria ser testada nos aproximadamente 30% dos pacientes de câncer de mama cujas células tumorais superexpressam essa proteína. Agora um outro agente – um inibidor de cinases Raf – pode ser testado em pacientes com melanomas avançados, nos quais a molécula cinase Raf-B é freqüentemente (70% dos casos) mutante e ativada constitutivamente. (De maneira interessante, em último caso, um inibidor B-Raf falhou em parar efetivamente a proliferação de melanomas metastáticos, enquanto o seu uso em combi-

nação com uma droga quimioterapêutica convencional gerou respostas dramáticas, embora não-suficientes.)

Mais freqüentemente, a escolha de indicações não é nem racional nem a mais adequada. Qual classe de pacientes de câncer deve ser tratada, por exemplo, com uma droga que atua como um

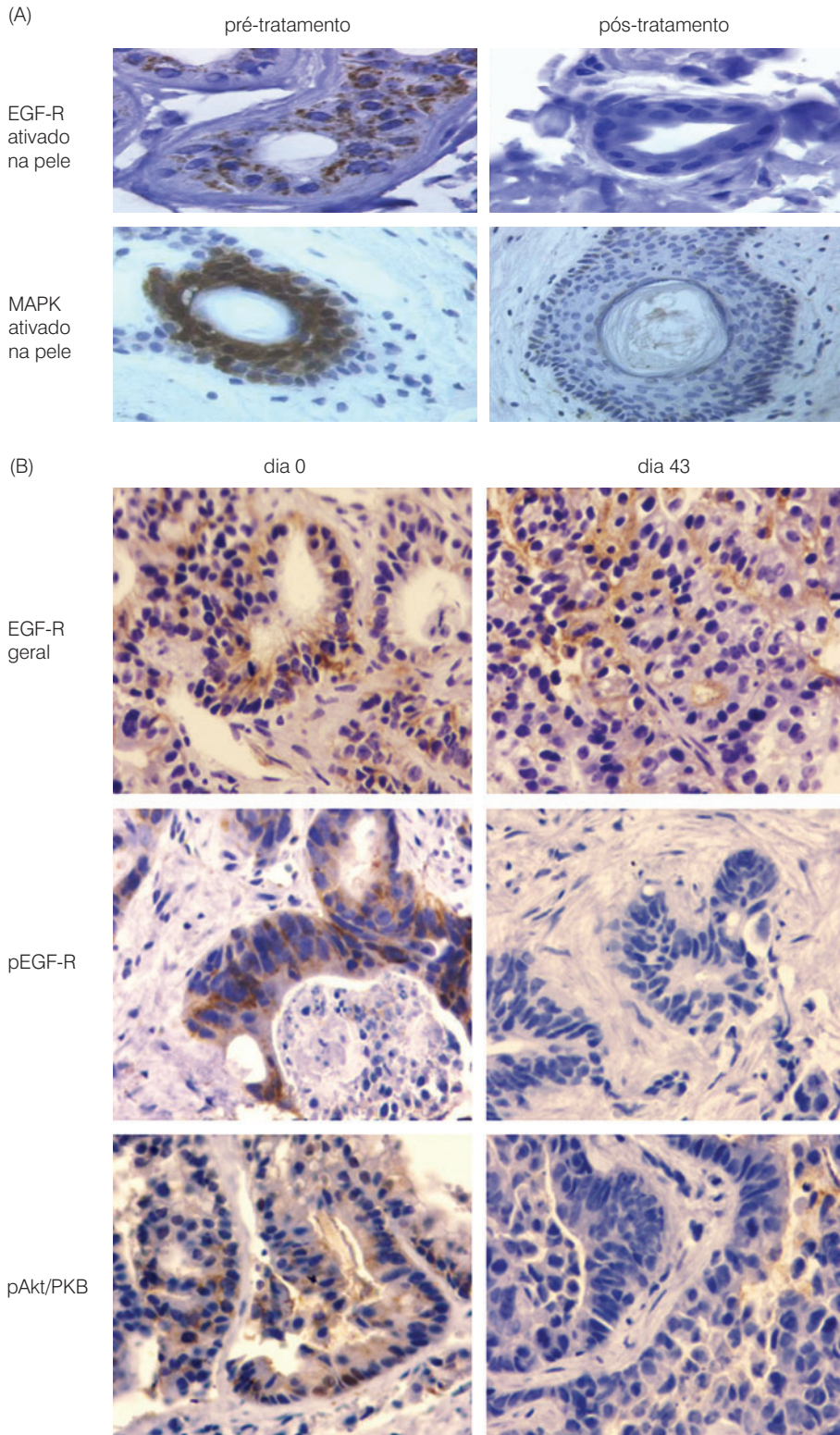
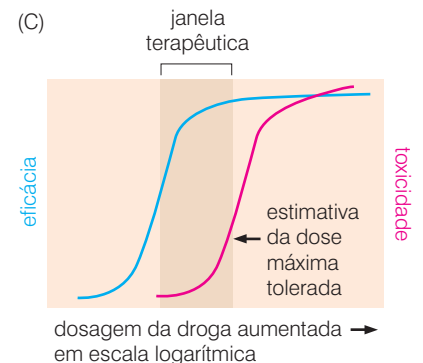


Figura 16.21 Medidas de farmacodinâmica e determinação da janela terapêutica A extensão da inibição de EGF-R em um tumor pode, em princípio, ser estimada pela medida dos efeitos do tratamento da droga sobre EGF-R na pele; a última é prontamente acessada por pequenas biópsias de pele. Nos casos ilustrados aqui, pacientes sob tratamento estavam sofrendo de uma variedade de tumores, incluindo carcinomas de ovário, pulmão, cólon, próstata e cabeça e pescoço. (A) Mostrados aqui estão os efeitos do tratamento, de um paciente de câncer, com lressa, um inibidor de tirosina cinase EGF-R de baixo peso molecular (veja a Figura 16.31). Os painéis superiores mostram imunohistoquímica usando um anticorpo contra fosfo-EGF-R (*marrom*), isto é, a forma ativada do receptor. Os painéis inferiores usaram um anticorpo contra fosfo-MAPK, a forma ativada dessa cinase. Ambas as medidas dependem da sinalização normalmente intensa que ocorre nos queratinócitos presentes nos folículos pilosos. (B) Os efeitos de um anticorpo monoclonal anti-receptor EGF (EGF-R) (chamado de EMD7200) foram estimados por coloração imuno-histoquímica de uma biópsia de carcinoma de cólon. Neste caso, um tratamento de longo prazo resultou em uma redução mínima no nível geral do EGF-R (*marrom*) e uma forte redução no nível do receptor fosforilado (e, por isso, ativado) (*marrom*; pEGF-R). A redução no nível de Akt/PKB ativado, fosforilado (*marrom*; pAkt/PKB) foi leve, e o paciente mostrou apenas uma resposta parcial a essa terapia por anticorpo, o que pode ter refletido essa mínima redução da atividade de Akt/PKB nas células tumorais. (C) Medidas de farmacodinâmica como essas, unidas a estudos de farmacocinética e toxicidade, definem a *janela terapêutica* na qual uma droga deve ser administrada – a escala das concentrações que são eficazes sem gerar um nível inaceitável de efeitos colaterais tóxicos. (A e B, cortesia de J. Baselga.)



indutor geral de apoptose em vários tipos de células cancerosas? Como uma droga direcionada contra a cinase Akt/PKB antiapoptótica deveria ser usada na clínica? Irá uma droga anti-receptor de EGF ser útil em carcinomas que expressam níveis elevados dessa proteína receptora? Como veremos mais tarde neste capítulo, certos tipos de câncer que nunca seriam identificados pela genética ou biologia molecular como alvos atrativos para o tratamento com drogas mostram-se, ocasionalmente, muito suscetíveis a certas drogas sob desenvolvimento. Nesses casos, a utilidade terapêutica de tais drogas é descoberta apenas por acaso.

(Dadas as maneiras arbitrárias pelas quais as indicações de tumores são escolhidas em vários testes de Fase II, podemos nos surpreender como várias drogas candidatas, verdadeiramente úteis, foram descartadas no passado simplesmente porque a boa sorte não as favoreceu no esquema desses testes. Assim, uma droga pode ter uma eficácia espetacular contra carcinomas gástricos, mas o seu efeito nunca é percebido, uma vez que ela é testada em testes de Fase II por seus efeitos em carcinomas pancreáticos ou de pulmão, nos quais ela falha em mostrar qualquer efeito útil e, por isso, é excluída de qualquer desenvolvimento futuro ou teste clínico.)

Se os testes de Fase II geram sinais claros de eficácia para tratar certos tipos de câncer com uma droga candidata, os testes de Fase III, utilizados em populações de pacientes muito maiores, serão começados. Estes testes são muito caros, mas, no final das contas, são críticos, pois apenas eles podem mostrar, pela primeira vez, se qualquer resposta clínica relacionada a uma droga é estatisticamente significativa. Os resultados desses testes normalmente se tornam convincentes apenas se experimentos controle são realizados pelo tratamento de populações com a mesma quantidade de pacientes com uma outra terapia em paralelo, em geral uma que já é licenciada e está em amplo uso. De modo importante, o licenciamento de uma droga candidata para indicação específica de doença (nos Estados Unidos, pelo FDA, Food and Drug Administration) em geral depende de se ela gera um benefício terapêutico que é maior, de forma mensurável, do que o padrão existente de cuidado.

Pacientes em testes de Fase III em geral passaram por várias rodadas prévias de quimioterapia com vários tipos de agentes citotóxicos, cada um acabando com recidivas e o surgimento de tumores que são *refratários* (não-responsivos, insensíveis) a terapias estabelecidas. Além disso, esses tumores freqüentemente são muito agressivos. Isso ajuda a explicar por que a barra de aprovação, pelo FDA, de uma droga ou combinação de drogas não é tão alta, uma vez que as drogas em testes de Fase III são destinadas a atacar os tipos mais difíceis de câncer. Assim, melhoras na qualidade de vida dos pacientes ou a redução temporária de um tumor podem satisfazer mesmo sem melhoras na sobrevivência em longo prazo.

Como uma ilustração disso, podemos citar o desenvolvimento de tratamentos atuais para o câncer de pâncreas. Essa doença é um exemplo extremo, para ter certeza, na qual foi observado que o tempo de sobrevivência por cinco anos (a partir do momento do diagnóstico inicial) era consistentemente menor do que 4%. Gemcitabina (difluorodeoxicidina), que é muito empregado como terapia para carcinoma pancreático, recebeu aprovação inicial pelo FDA para tratar esse tumor porque, em alguns pacientes, resultou em uma melhora nos sintomas, ganho de peso e uma estabilização temporária no crescimento do tumor, embora ofereça apenas um modesto aumento no tempo de sobrevivência após o diagnóstico da doença: pacientes tratados com gemcitabina tiveram um tempo de sobrevivência médio de 5,65 meses comparado àqueles para os quais foi dado o tratamento-padrão – 5-fluorouracil (5-FU), que deu um tempo médio de sobrevivência de 4,41 meses (Figura 16.22). Essas histórias e similares revelam o quão desesperada é a necessidade de meios verdadeiramente efetivos de tratar tumores sólidos. Ela também ilustra o fato que as exigências do FDA para aprovar agentes anticâncer são muito menos severas do que para outras situações de doença, em que uma eficácia muito maior é necessária para obter o licenciamento de novas drogas.

Apesar de tudo, mesmo com essas exigências regulatórias relativamente modestas, as outras complicações do desenvolvimento de drogas descritas aqui mantêm a velocidade dos sucessos atuais para o desenvolvimento de drogas anticâncer extremamente baixa. É possível uma droga em centenas tenha avançado todo o caminho pelo “túnel” do desenvolvimento de drogas, a partir dos testes *in vitro*, pelos testes de Fase III, que culminam em algum claro melhoramento nas

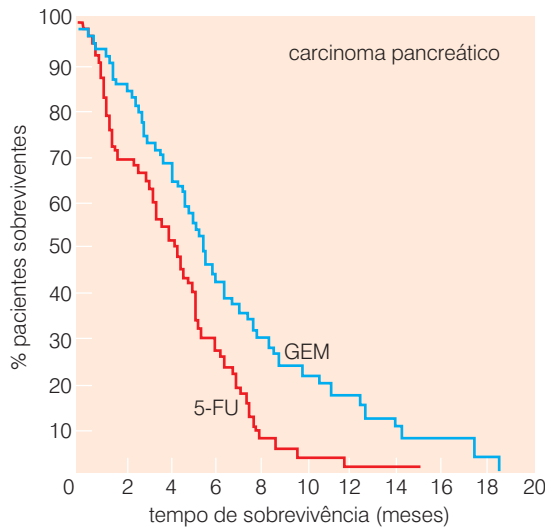


Figura 16.22 Gemcitabina como tratamento para câncer pancreático Este gráfico de Kaplan-Meier ilustra a alta mortalidade gerada pelo câncer pancreático. Pacientes tratados com gemcitabina (GEM) viveram um pouco mais do que aqueles tratados com 5-fluorouracil (5-FU) – o padrão de tratamento na década de 1990. Os dois agentes são derivados de pirimidina, cuja citotoxicidade deriva de sua capacidade de inibir a síntese de DNA, em parte pela incorporação errada no DNA. (5-FU também interfere na biosíntese de pirimidina.) Como é visto, o tratamento com gemcitabina ofereceu apenas um modesto incremento na sobrevivência dos pacientes nesse estudo reportado em 1997, mas, apesar disso, esse efeito foi o bastante para permitir a sua aprovação pelo U.S. Food and Drug Administration. (A partir de H.A. Burris 3rd, M.J. Moore, J. Andersen et al., *J. Clin. Oncol.* 15:2403-2413, 1997.)

respostas do paciente e licenciamento pelo FDA. (Depois de ter ocorrido o licenciamento, um teste de Fase IV pode ser conduzido para determinar como uma droga recentemente introduzida se compara com outras drogas usadas com indicações similares, como alguns subgrupos de pacientes respondem à droga e se preocupações sobre a segurança da droga finalmente emergem a partir do seu uso em populações muito grandes de pacientes.)

16.10 Tumores com frequência desenvolvem resistência a terapias inicialmente efetivas

Uma complicação que segue todas as drogas anticâncer é ilustrada pelo comportamento do camundongo transgênico *HER2/neu*, no qual o mutante transgene oncogênico foi programado para induzir tumores mamários com uma programação previsível e pode ser desativado depois disso. Enquanto tumores de mama primários e metástases induzidas por transgene colabaram quando o transgene *HER2/neu* foi desativado, novos tumores apareceram novamente na maioria desses camundongos entre 1 e 9 meses mais tarde (veja a Tabela 16.1). Esses tumores claramente representam variantes dos observados inicialmente que desenvolveram meios alternativos de propulsar o seu crescimento – isto é, se tornaram independentes da expressão do oncogene *HER2/neu*.

Como vimos no Capítulo 12, os genomas mutáveis, instáveis, das células do câncer continuamente geram novos alelos e novas configurações genéticas. Células cancerosas em desenvolvimento podem ser exigentes entre essas variações genéticas, procurando por combinações que melhorem a sua habilidade para sobreviver e proliferar. Nesse exemplo *HER2/neu*, o número relativamente pequeno de células cancerosas que sobreviveram à desativação do oncogene parecem ter perdido meses desde então esperando por oncogenes recentemente surgidos (ou outros alelos causadores de câncer) nos seus genomas que podem permitir que elas recomencem o seu programa de proliferação agressiva. As raras células que conseguiram adquirir essa mudança genética/epigenética nova iniciaram a expansão de forma clonal que levou aos tumores recidivos.

Uma dinâmica similar complica quase todos os tipos de terapias de câncer, na qual sucessos clínicos iniciais na redução de populações de células tumorais são normalmente seguidas pelo ressurgimento de populações de células tumorais em pacientes que, por um meio ou outro, desenvolveram resistência ao tratamento inicial, adquirindo assim um novo prazo de vida.

Por exemplo, uma variedade de tumores humanos que ocorrem comumente, incluindo de mama, pulmonar de pequenas células e carcinomas de ovários, respondem bastante, no início, a drogas citotóxicas que em geral são utilizadas na quimioterapia, mas, depois de um

Tabela 16.2 Exemplos de Mecanismos de Resistência a Drogas desenvolvidos por Tumores

Mecanismo geral	Exemplo
(A) Mecanismos baseados em células	
Acúmulo intracelular da droga diminuído	superexpressão da glicoproteína P, bomba de efluxo multidrogas
Ativação da droga diminuída	ativação metabólica diminuída da pró-droga pela perda da expressão de um citocromo P-450
Inativação aumentada da droga ou dos intermediários tóxicos	aumento da nucleosídeo deaminase que inativa análogos de nucleosídeos, aumento na detoxificação da glutathione-S-transferase (GST)
Reparo aumentado do dano induzido pela droga	reparo aumentado das ligações cruzadas do DNA induzidas por cisplatina, uma droga quimioterapêutica
Resistência aumentada a toxicidade induzida pela droga	inativação das respostas apoptóticas pela mutação de p53 ou superexpressão de Bcl-2
Alvos da droga alterados (quantitativa ou qualitativamente)	superexpressão de Bcr-Abl, alteração da fenda catalítica de Bcr-Abl
(B) Mecanismos dependentes do hospedeiro	
Barreiras anatômicas a drogas (santuários de tumores)	crescimento de tumor no cérebro atrás da barreira hematoencefálica, ou em testes
Interações hospedeiro-droga: inativação aumentada da droga por tecidos normais	detoxificação da droga quimioterapêutica ciclofosfamida no fígado
Interações hospedeiro-droga: ativação diminuída da droga por tecidos normais	ativação diminuída da ciclofosfamida no fígado

Adaptada de J. Moscow, C.S. Morrow and C.H. Cowan, in J. Holland and E. Frei (eds.), Drug Resistance and its Clinical Circumvention in Cancer Medicine, 6th ed. Hamilton, ON: B.C. Decker, 2003.

tempo, se tornam refratários a tratamentos com drogas e, por isso, reincidem, como sugerido antes. Grande parte dessa resistência adquirida é atribuída à plasticidade genética e, portanto, fenotípica das populações de células cancerosas.

Os mecanismos adquiridos de resistência a drogas são bastante variáveis e ilustram a perspicácia das células cancerosas no planejamento de várias manobras para evitar a morte por drogas quimioterapêuticas. Como indicado na Tabela 16.2, alguns desses mecanismos envolvem a perda da habilidade para “importar” moléculas de drogas pela membrana plasmática ou uma habilidade adquirida para bombear moléculas de drogas para fora através dessa membrana. Outros dependem de uma habilidade adquirida para metabolizar moléculas de drogas, em alguns casos usando as mesmas classes de enzimas que são importantes na detoxificação de outros tipos de compostos tóxicos que entraram na célula (Seção 12.6). As células também podem neutralizar componentes da sua maquinaria apoptótica ou podem adquirir uma habilidade maior de reparar moléculas de DNA danificadas por quimioterápicos ou por radiação.

Esses comportamentos representam uma mudança geral em todos os tipos de terapia antitumor. A única solução clara para as manobras evasivas tomadas por células cancerosas deriva do fato de que a maioria dos mecanismos de resistência é adquirida a uma probabilidade relativamente baixa por geração de células. Como consequência, aplicando duas drogas não-relacionadas simultaneamente, a probabilidade das populações de células tumorais em gerar variantes que podem sobreviver a esse ataque duplo é grosseiramente igual ao quadrado da probabilidade de adquirir resistência a um único agente, e a probabilidade de sobreviver a uma terapia tripla deveria ser o cubo dessa baixa probabilidade, etc.

Entretanto, mesmo essas estratégias de terapia com múltiplas drogas são frequentemente despistadas pelas células cancerosas, que desenvolvem estratégias potentes para evitar a morte, como a aquisição de resistência a múltiplas drogas (MDR). Por exemplo, o alto nível de expressão do gene *MDR1*, que codifica para uma bomba transmembrana de efluxo de drogas, permite que as células cancerosas excretem de maneira eficiente uma variedade de drogas não-relacionadas quimicamente, diminuindo assim a concentração da droga intracelular para níveis subtóxicos (Figura 16.23). De forma similar, a inativação de certas partes da maquinaria apoptótica também pode conferir resistência concomitante a vários agentes citotóxicos distintos. Apesar dessas complicações, existe um consenso geral entre os desenvolvedores de drogas de que as monoterapias envolvendo ou drogas de baixo peso molecular ou moléculas biológicas provavelmente não curarão a maioria dos tipos de câncer e de que terapias efetivas com múltiplos agentes devem ser desenvolvidas se curas duráveis forem alcançadas no futuro.

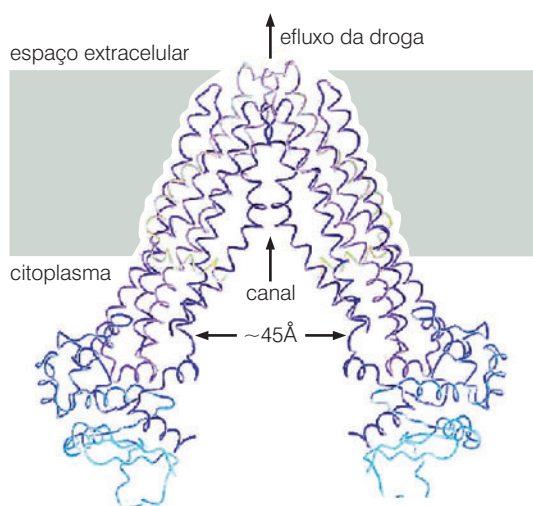


Figura 16.23 Resistência a múltiplas drogas e à glicoproteína P O gene *MDR1* codifica para a glicoproteína P, a proteína que com freqüência está presente em níveis elevados nas células cancerosas sendo tratadas com vários tipos de quimioterapia. Glicoproteína P, cuja estrutura é mostrada aqui, é uma proteína transmembrana dependente de ATP de 170 kDa que pode bombear uma ampla variedade de moléculas de droga para fora das células. Ela é membro de uma ampla família de moléculas transportadoras em mamíferos, das quais 49 foram descobertas até agora. As suas ações parecem ser responsáveis pela aquisição de resistência a drogas por uma variedade de tipos de tumores humanos sob tratamento com drogas quimioterapêuticas de baixo peso molecular. (A partir de D. Mahadevan a A.F. List, Blood 104:1940-1951, 2004.)

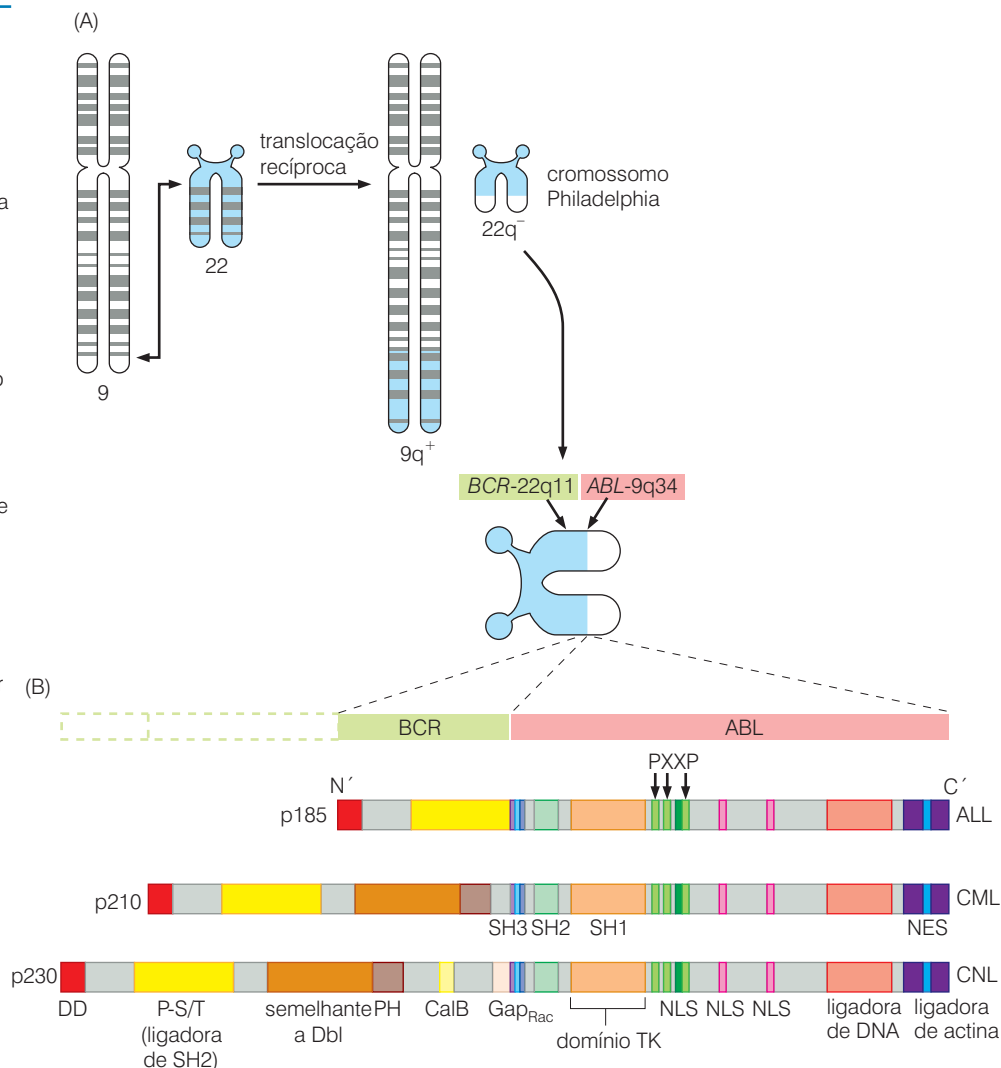
Com essas considerações em mente, estudaremos uma série de histórias ilustrativas nas seções que seguem. Cada uma se refere a um tipo de droga e o seu alvo dentro das células cancerosas. As histórias são arranjadas em uma ordem, começando com uma terapia bem-estabelecida e terminando com uma especulativa que gera grande esperança, mas ainda está longe de validação clínica. Em alguns casos, a terapia específica que foi desenvolvida foi inspirada pelas descobertas de proteínas que funcionam mal dentro das células cancerosas; essas descobertas permitiram que o desenvolvimento de drogas fosse prosseguido lógica e metodicamente. Em outros casos, golpes de boa sorte ou saltos intuitivos permitiram o desenvolvimento de compostos altamente ativos. Inevitavelmente, essas histórias representam escolhas arbitrárias e desenhos a partir de um vasto grupo de agentes sob investigação ou desenvolvimento atualmente. Elas representam os precursores de um grande grupo de tais drogas que serão desenvolvidas e licenciadas para uso clínico nos próximos anos.

16.11 O desenvolvimento do Gleevec ladrilhou o caminho para o desenvolvimento de vários outros compostos-alvo

Nas seções anteriores, fizemos repetidas referências à oncoproteína Bcr-Abl e a estratégias experimentais para antagonizá-la. Agora, voltaremos atrás e revisaremos parte da história de como a oncoproteína Bcr-Abl foi descoberta e validada como um alvo para droga atrativo e finalmente utilizada como objeto de desenho racional de drogas. Essa história é valiosa, ainda que apenas para ilustrar o longo curso pelo qual o desenvolvimento de uma droga passa desde o início da descoberta na bancada do laboratório até a clínica oncológica.

Essa história em particular inicia em 1914, quando o citologista alemão Theodor Boveri propôs que os defeitos cromossômicos poderiam fazer com que uma célula proliferasse anormalmente, resultando na formação de algum tipo de câncer. Quase a metade de um século se passou antes que a idéia de Boveri recebesse alguma validação. Em 1960, dois citologistas que trabalhavam na Filadélfia notaram que um Cromossomo 22 anormal, pequeno, de forma rara estava presente caracteristicamente na grande maioria das células da leucemia mielogênica crônica (CML); desde esse momento, ele foi chamado de cromossomo Philadelphia ou simplesmente Ph¹. Passaram-se outros 12 anos antes que um pesquisador, em Chicago, demonstrasse que uma translocação recíproca entre os Cromossomos 9 e 22 era responsável por criar o cromossomo Ph¹ (primeiramente descrito na Seção 4.6). (Visto que um bloco maior do Cromossomo 22 é doado para a ponta do Cromossomo 9 e este, por sua vez, doa um pedaço menor para o Cromossomo 22, isso deixa o Cromossomo 22 ainda menor em tama-

Figura 16.24 Origem e estrutura da proteína Bcr-Abl (A) Mais de 95% dos casos de leucemia mielogenosa crônica (CML) exibem o cromossomo Philadelphia, que resulta de uma translocação recíproca entre os Cromossomos 9 e 22. A região q34 do Cromossomo 9, que carrega a maior parte do gene *ABL*, é transferida para a região q11 do Cromossomo 22, deslocando um segmento maior do Cromossomo 22 que é translocado reciprocamente para o Cromossomo 9. O resultado é o Cromossomo 22 truncado (i. e., 22q-), que muitas vezes é chamado de cromossomo Philadelphia (Ph¹), e uma fusão da porção 5' do gene *ABL* com a porção proximal 3' do gene *BCR*, que normalmente reside no 22q11. (B) Dependendo da localização precisa do ponto de quebra em BCR, três proteínas de fusão Bcr-Abl distintas podem ser formadas, as quais são encontradas em ALL (leucemia linfoblástica aguda), CML e CNL (leucemia neutrofílica crônica). Cada um desses genes de fusão *BCR-ABL* codificam para uma proteína de múltiplos domínios (e assim, multifuncional). (A partir de A.S. Advani and A.M. Pendergast, *Leuk. Res.* 26:713-720, 2002.)



nho; este resto do 22 mais o pequeno segmento translocado é Ph¹; veja a Figura 16.24A.) A aberração cromossomal – claramente a consequência de uma mutação somática – foi proposta como uma causa em potencial dessa malignidade. Como mencionado antes, agora sabemos que essa translocação em particular está presente em mais de 95% dos casos de CML.

Os genes que foram fusionados por essa translocação permaneceram desconhecidos por outra década. Finalmente, em 1982, biólogos moleculares descobriram que *ABL*, o homólogo humano da oncoproteína *c-abl* de camundongo, participa diretamente dessas translocações cromossomais, tornando-se fusionado com um segundo gene, ainda desconhecido. Logo observou-se que os pontos de quebra desse outro gene (os sítios do cromossomo nos quais ele se fundia ao gene *ABL*) estavam espalhados por várias quilobases de DNA, gerando o nome “região de ponto de quebra de grupamento” (*breakpoint cluster region*) ou simplesmente *BCR*. Na verdade, três proteínas de fusão distintas surgem pela inclusão de proteínas Bcr de vários tamanhos no N-terminal das proteínas de fusão com quase toda a proteína Abl no C-terminal (Figura 16.24). Como indicado na figura, as diferentes proteínas de fusão tendem a ser associadas a tipos distintos de leucemia.

Dentro dos dois anos da sua descoberta, foi observado que a proteína Bcr-Abl funciona como uma tirosina cinase ativada constitutivamente. A esse respeito, ela funciona como a oncoproteína Abl do vírus Abelson da leucemia de camundongo. O genoma desse retrovírus carrega um oncogene *abl* derivado do proto-oncogene correspondente que reside no genoma do camundongo normal.

Em 1990, um cDNA que codifica para a proteína de fusão Bcr-Abl foi introduzido em um vetor retroviral, e então foi observado que o vírus resultante induz uma leucemia em camundongos que se parece muito com a CML de humanos. Como na doença humana, essa leucemia envolve grandes números de granulócitos totalmente diferenciados no sangue. Sob certas condições, a leucemia murina, como a sua contraparte humana, progrediu para uma “crise blástica”, envolvendo o acúmulo de células imaturas das linhagens linfóide ou mielóide (veja a Figura 12.4). Essas observações nos camundongos representaram a primeira prova formal de que a proteína de fusão Bcr-Abl funciona como a força motiva central da leucemogênese em CML.

Infelizmente, essa demonstração do papel crítico da Bcr-Abl não revelou nada sobre o mecanismo pelo qual ela funciona. A complexidade confusa da sinalização por Bcr-Abl é indicada pelo arranjo diverso dos domínios estruturais e funcionais nas duas proteínas contribuintes (veja a Figura 16.24B). Ao todo, os domínios presentes nessa proteína de fusão permitem ativar a via Ras, a via PI3 cinase-Akt/PKB, a via Jak-STAT e os fatores de transcrição, incluindo Jun, Myc e NF- κ B. Além disso, a proteína Rac semelhante à Ras, que regula atividades diversas como migração celular, sobrevivência e proliferação, é ativada, como são as duas tirosinas cinases não-receptoras, Hck e Fes (não-mostrado). Essas várias associações permitem que a proteína Bcr-Abl estenda o seu alcance para quase todos os circuitos reguladores que governam a proliferação e sobrevivência celular.

Apesar dessa complexidade, foi observado que o domínio tirosina cinase da Bcr-Abl, derivado a partir da proteína proto-oncogene Abl, é um elemento-chave na leucemogênese. Por exemplo, alterações sutis da proteína Bcr-Abl que inativaram a sua atividade catalítica de tirosina cinase levaram à perda total da sua função transformante. No início dos anos 1990, um programa de pesquisa foi iniciado para desenvolver antagonistas da atividade tirosina cinase de Bcr-Abl, de baixo peso molecular. Surgiu uma droga, denominada de formas variadas – mesilato de imatinib, STI-571, Glivec e Gleevec (veja a Figura 16.10A) – que era capaz de se ligar à fenda catalítica da tirosina cinase de Bcr-Abl. Como é o caso com todas as outras cinases dessa família, a fenda está localizada entre os dois principais lobos da proteína cinase (veja a Figura 16.10B).

Mesmo que o domínio cinase de Abl compartilhe cerca de 42% de identidade de aminoácidos com um grande número de outras cinases, foi observado que os efeitos inibitórios do Gleevec sobre Bcr-Abl eram relativamente específicos (veja a Figura 16.15). Subseqüentemente foi observado que outras quatro tirosinas cinases – aquelas pertencentes aos receptores PDGF (α e β) e Kit, assim como a proteína Arg (gene relacionado a Abelson) – também eram inibidas por Gleevec. Como consequência, essa droga, quando utilizada em concentrações terapêuticas, parece ter como alvo apenas 4 das 90 tirosinas cinases humanas. Como a maioria dos outros inibidores de cinase, a molécula de Gleevec se associa com o bolsão de ligação a ATP do domínio cinase de Abl (veja a Figura 16.16). Enquanto outros inibidores de cinase bloqueiam a ligação de ATP nessa fenda, Gleevec funciona de forma diferente: ele se liga e estabiliza uma conformação cataliticamente inativa dessa enzima.

Esse sucesso com Gleevec encorajou vários outros esforços para criar antagonistas de baixo peso molecular de cinases, que se observou terem certas vantagens terapêuticas quando comparados com anticorpos monoclonais anti-receptores (Tabela 16.3). Além disso, esse sucesso incentivou químicos farmacêuticos a tentar fazer inibidores de tirosinas cinases estritamente específicos, alguns dos quais têm demonstrado uma especificidade extraordinária.

Por 1996, foi observado que o Gleevec era capaz de inibir o crescimento de células CML *in vitro*, enquanto não tinha efeito sobre células normais da medula óssea. Mais especificamente, a proliferação de células dependentes de Bcr-Abl poderia ser inibida a concentrações de droga tão baixas quanto 40 nM, indicando uma alta afinidade do Gleevec pela fenda catalítica do domínio tirosina cinase. (Células que dependem de Bcr-Abl para sobreviver podem ser forçadas a entrar em apoptose pela inibição da função de cinase de Abl pelo Gleevec.) Os testes clínicos iniciais, iniciados em 1998, revelaram remissões da doença em todos os 31

Tabela 16.3 Poderes e defeitos de anticorpos anti-receptor contra inibidores de tirosina cinases de baixo peso molecular como agentes anticâncer^a

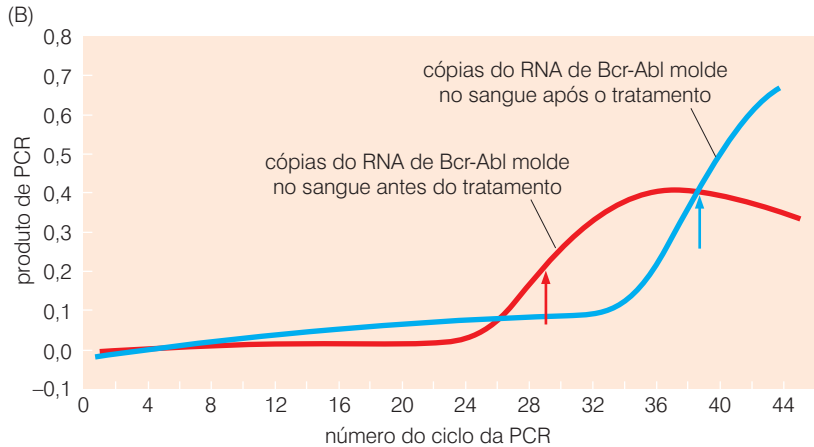
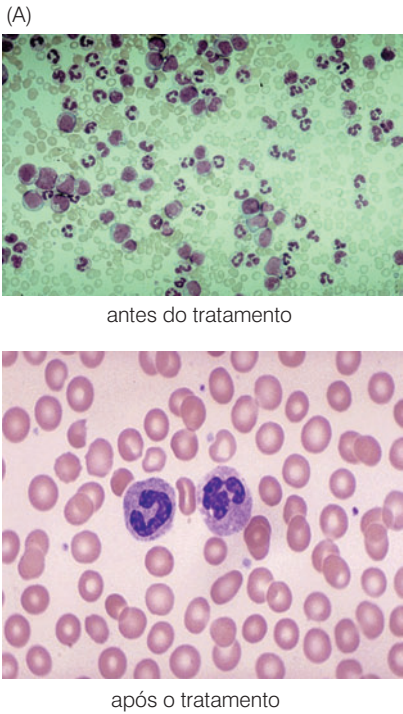
	Molécula pequena	Anticorpo
Alvo	domínio tirosina cinase	receptor ectodomínio
Especificidade	+++	++++
Ligação	a maioria é rapidamente reversível	receptor internalizado, regenerado apenas lentamente
Dosagem	oral diariamente	intravenosa, ≤ semanalmente
Distribuição nos tecidos	mais completa	menos completa
Toxicidade	erupções, diarreia, pulmonar	erupções, alergia
Citotoxicidade celular dependente de anticorpo	não	possivelmente

^aCortesia de N.J. Meropol e a partir de N. Damjanov e N. Meropol, *Oncol. (Huntington)* 18:479-488, 2004.

pacientes de CML tratados, com apenas mínimos efeitos colaterais registrados, mesmo quando administrado diariamente durante vários anos. Quatro anos mais tarde, 6 mil pacientes já haviam entrado nos testes clínicos com Gleevec.

O tratamento de CML em estágio inicial (crônico) com Gleevec levou a uma resposta hematológica em 90% dos casos: análises microscópicas de esfregaços de sangue revelaram uma mudança profunda na composição celular do sangue (Figura 16.25A), e análises por PCR revelaram uma diminuição extraordinária nos níveis de mRNA de *BCR-ABL* nas células do sangue (Figura 16.25B). Em 50% dos casos, o cromossomo Philadelphia translocado não é mais detectado por análises cariotípicas das células brancas de pacientes. Cerca de 60% dos pacientes que já progrediram para uma crise blástica responderam ao Gleevec, mas eles geralmente reincidiram após um período de alguns meses.

Figura 16.25 Medida das respostas ao tratamento com Gleevec (A) Os sucessos do Gleevec no tratamento de pacientes com leucemia mielógena crônica (CML) pode ser avaliado a partir de análises citológicas do sangue dos pacientes. Como visto aqui, o tratamento com Gleevec converteu o esfregaço de sangue de um estado no qual várias células de leucemia (*grandes, núcleo escuro, acima*) se parecem com aquelas nas quais apenas granulócitos normais são visíveis (*abaixo*) entre as células vermelhas do sangue. (B) Uma medida mais sensível e quantitativa do sucesso terapêutico provém do uso de medidas quantitativas pela reação em cadeia da polimerase (qPCR) do nível do mRNA de *Bcr-Abl* (que é inicialmente transcrito de forma reversa antes da amplificação por PCR). Em um paciente não-tratado (*curva vermelha*), 50% da amplificação máxima do gene mediada por PCR são observados em torno do 29º ciclo de amplificação gênica (na qual cada ciclo resulta na duplicação da sequência amplificada). Entretanto, depois do tratamento com Gleevec (*curva azul*), um grau comparável de amplificação somente é alcançado em torno do 39º ciclo (*seta azul*), indicando que as células que estão expressando o RNA de *Bcr-Abl* estão presentes em um nível que foi reduzido por um fator de aproximadamente 2¹⁰. Ensaio baseado em PCR podem detectar tão pouco quanto uma célula CML dentre 10⁵ a 10⁶ células sanguíneas vermelhas normais. (A e B, cortesia de B.J. Druker.)



Estudos iniciais indicaram que os pacientes normais de fase crônica sob tratamento correm um risco de cerca de 10% ao ano de reincidir pela progressão para uma fase de crise de CML; os índices de reincidência de pacientes recentemente diagnosticados, que em geral estão em um estágio inicial da progressão da doença, podem ser tão baixos quanto 5% ao ano.

Os mecanismos moleculares que permitem que as células tumorais finalmente escapem da inibição por Gleevec são interessantes, uma vez que eles projetam uma luz adicional sobre a oncoproteína Bcr-Abl e sua ação e, mais geralmente, revelam como as células cancerosas podem adquirir resistência a drogas altamente específicas. Análises das seqüências *BCR-ABL* nos tumores de pacientes com a doença recorrente resistente a Gleevec revelaram que 29 dos 32 tumores abrigavam mutações no gene *BCR-ABL*; no total, isso gerou substituições de 13 resíduos de aminoácidos distintos no domínio da cinase. (Uma outra dúzia foi catalogada em estudos subseqüentes.)

Algumas dessas mutações previnem que Gleevec se ligue à fenda catalítica ou interferindo diretamente em sua ligação ou, menos diretamente, pela criação de uma mudança estereoquímica na oncoproteína (Figura 16.26A e B). Em uma minoria de pacientes, a resistência a Gleevec foi alcançada pela amplificação do gene *BCR-ABL* nas suas células leucêmicas, ge-

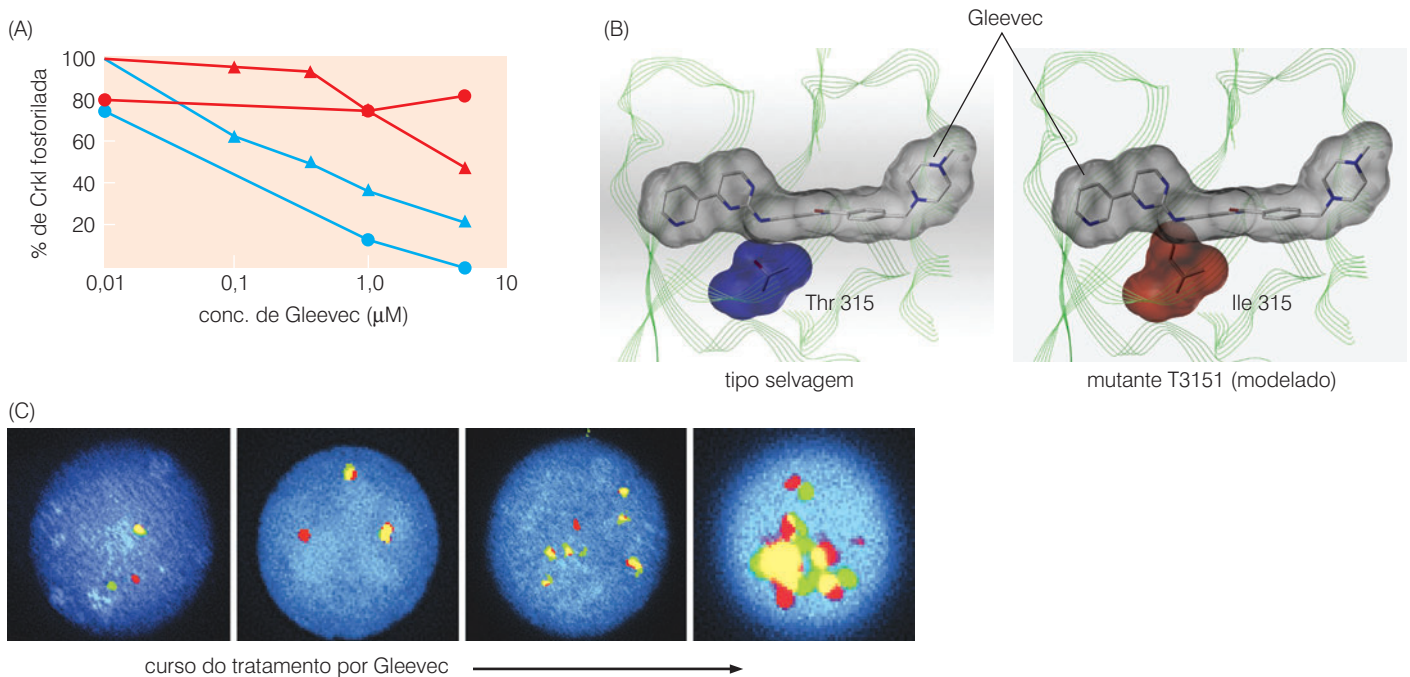


Figura 16.26 Aquisição de resistência ao Gleevec por células CML. A habilidade do Gleevec em inibir a atividade de Bcr-Abl cinase altera dramaticamente as recidivas e a resistência adquirida ao tratamento por drogas. (A) Neste caso, a atividade de cinase foi medida em células de leucemia isoladas pelo grau de fosforilação de Crkl, uma proteína que é um bom substrato para fosforilação por Bcr-Abl. No início da terapia, a Bcr-Abl cinase (em células de leucemia cultivadas) sofreu cerca de 50% de inibição na presença de aproximadamente 0,1 μM de Gleevec em dois pacientes (*triângulos azuis*, *círculos azuis*). Entretanto, depois que os pacientes desenvolveram resistência ao Gleevec, cerca de 8 μM de concentração da droga foram necessários para inibir a Bcr-Abl cinase de um paciente (*triângulos vermelhos*), enquanto o outro paciente era totalmente resistente à droga (*círculos vermelhos*). (B) A molécula de Gleevec é capaz de se encaixar fortemente em uma cavidade molecular criada, em parte, por um resíduo de treonina (*azul*) na posição 315 da proteína Bcr-Abl tipo selvagem (*esquerda*; veja também a Figura 16.10C). Entretanto, em uma Bcr-Abl mutante encontrada em células de leucemia de um paciente resistente a Gleevec (*direita*), esse resíduo de treonina foi

substituído por uma isoleucina (*marrom*), que faz uma protuberância para dentro da cavidade de ligação à droga e interfere na inserção de Gleevec nessa cavidade. (C) O número de cópias do gene *BCR-ABL* nas células leucêmicas de pacientes foi medido aqui usando hibridização fluorescente *in situ* (FISH). Os núcleos são visualizados em azul, as seqüências de ABL em vermelho e as seqüências de BCR em amarelo. Amarelo indica uma sobreposição das seqüências de ABL e BCR, isto é, sítios do gene fusionado criados pela translocação cromossomal. Os níveis do gene fusionado (*amarelo*) no início da terapia (*esquerda*) eram bastante baixos, mas, à medida que o tratamento iniciou (*da esquerda para direita*), os níveis da proteína fusionada (e, assim, da proteína de fusão Bcr-Abl) aumentaram progressivamente até que a leucemia do paciente se tornasse resistente ao tratamento por Gleevec. Neste paciente em particular, a resistência a Gleevec foi adquirida pelas células tumorais porque a proteína de fusão se tornou superexpressa, fazendo com que a concentração terapêutica normal de Gleevec não fosse suficiente para se ligar e inativá-la. (A partir de M.E. Gorre, M. Mohammed, K. Ellwood et al., *Science* 293:876-880, 2001.)

Tabela 16.4 Resposta alterada ao Gleevec pelas células de leucemia mielogenosa crônica após um extenso tratamento

	Número de pacientes com CML analisados	Média de IC ₅₀ do Gleevec para fosforilação de Crkl (μM)	Escala de IC ₅₀ do Gleevec (μM)
Pré-tratamento	6	0,45 ± 0,33	0,21-1,1
Após recidiva	5	7,5 ± 5,2	2,5-14,5

A partir de M.E. Gorre, M. Mohammed, K. Ellwood et al., *Science* 293:876-880, 2001.

rando níveis aumentados da oncoproteína que aparentemente não poderiam mais ser inibidas pelas concentrações de droga usadas para tratar os pacientes (Figura 16.26C).

Essas demonstrações de que a resistência adquirida ao Gleevec (Tabela 16.4) é normalmente acompanhada por alterações estruturais da proteína Bcr-Abl ou superexpressão dela fornecem provas convincentes de que a habilidade do Gleevec para evocar respostas terapêuticas pode ser atribuída diretamente aos seus efeitos sobre a proteína Bcr-Abl. Essa percepção ocorreu em uma etapa anterior pela introdução de mutações aleatórias em um vetor que codifica para a proteína Bcr-Abl, determinando, então, quais das formas mutantes resultantes dessa proteína eram capazes de resistir à inibição por Gleevec (Figura 16.27). Tal estratégia experimental, que utiliza células em cultura cujo crescimento e viabilidade são dependentes de Bcr-Abl (veja a Figura 16.17), podem, a princípio, revelar o espectro completo de alterações estruturais de Bcr-Abl que são capazes de restituir a sua resistência à inibição por Gleevec. Os resultados dessa triagem deverão ser valiosos no futuro para entender os mecanismos moleculares da resistência adquirida a drogas.

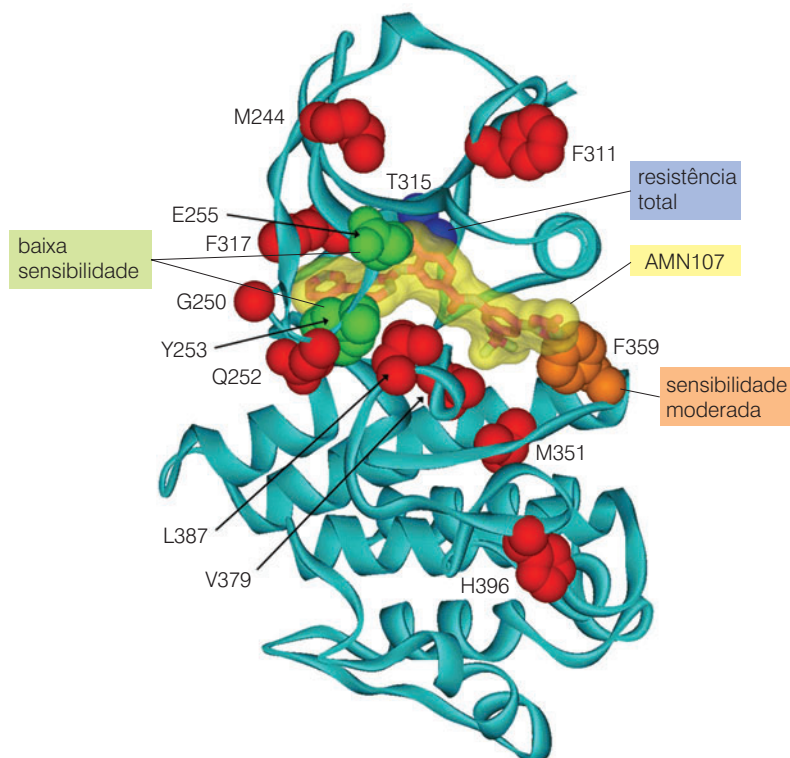
Pesquisas subseqüentes também levaram à descoberta de que outros inibidores de cinases, incluindo uma droga originalmente desenvolvida como um antagonista de Src, são bastante efetivos em baixas concentrações (< 10 nM) na ativação de oncoproteínas Bcr-Abl mutantes resistentes a Gleevec (Figura 16.28). Isso fornece esperança de que vários tumores resistentes a Gleevec possam ser efetivamente tratados, no futuro, com outros inibidores de cinases e que, em longo prazo, tratamentos concomitantes de pacientes com CML com vários inibidores reduzirão bastante a emergência de tumores resistentes a drogas.

A habilidade do Gleevec em também inibir o receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF-R) sugere que, um dia, ele possa ser útil no tratamento de outros tipos de malignidades também. Por exemplo, foram encontradas mutações nos genes que codificam para PDGF-Rα e Rβ em várias doenças **mieloproliferativas** crônicas, isto é, condições envolvendo níveis elevados na circulação de um ou outro tipo de célula que surge da linhagem mielóide da hematopoiese (veja a Figura 12.4). Realmente, pacientes que sofrem de uma dessas doenças – síndrome hipereosinofílica – têm mostrado uma **resposta completa** após o tratamento com Gleevec, com o desaparecimento virtual dos seus eosinófilos.

PDGF-Rβ é superexpressado em cerca de 85% dos meduloblastomas metastáticos, mas não em tumores não-metastáticos desse tipo. As células nesses crescimentos mais agressivos parecem contar com uma alça autócrina de PDGF- PDGF-R para direcionar a sua mobilidade e proliferação. Esse tipo de câncer comumente afeta crianças, e os meios terapêuticos para tratá-lo têm sido muito confinados à **radioterapia**, que tem sérios efeitos colaterais neurológicos em longo prazo. Em geral, a angiogênese em uma ampla variedade de tipos tumorais depende, em parte, do recrutamento de pericitos mediado por PDGF por suas células endoteliais vizinhas (veja a Figura 13.47). Como consequência, protocolos terapêuticos futuros para tratar esses tumores sólidos podem envolver Gleevec ou agentes que atuem de forma similar.

Os efeitos do Gleevec sobre uma terceira tirosina cinase – o receptor Kit – também o faz um agente atrativo para atacar tumores do estroma gastrointestinal (GISTs), um tumor relativamente incomum para o qual poucas opções terapêuticas têm estado disponíveis. O receptor Kit é tipicamente mutado nesses cânceres e parece representar a força mitogênica inicial nas células tumorais (veja a Figura 5.18). Em um estudo, respostas envolvendo a regressão clara do tumor foram

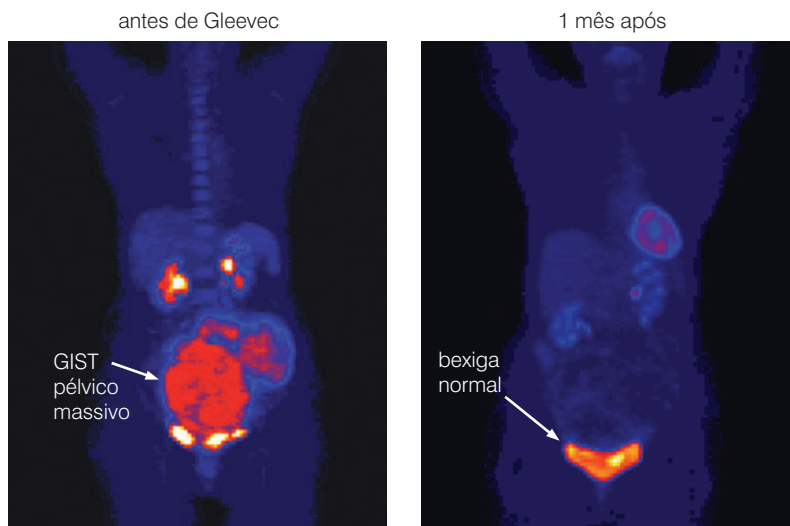
Figura 16.28 Inibidores reserva de Bcr-Abl para pacientes com tumores resistentes a Gleevec. O fato de pacientes na fase aguda (crise blástica) de CML frequentemente desenvolverem resistência a Gleevec (veja, por exemplo, a Figura 16.26) estimulou o desenvolvimento de inibidores alternativos da tirosina cinase Abl. Um desses inibidores, AMN107, está mostrado aqui (*modelo de espaço preenchido amarelo, figura em bastão cor de laranja*) em complexo com o domínio tirosina cinase de Bcr-Abl, no qual também estão indicados os sítios de várias substituições de aminoácidos encontradas nas formas mutantes de Bcr-Abl descobertas nos tumores resistentes a Gleevec de pacientes. (O número de esferas coloridas em um sítio indica o número de átomos presentes na cadeia lateral do aminoácido substituído.) Formas mutantes de Bcr-Abl resistentes a Gleevec que têm áreas de substituições de aminoácidos com *esferas vermelhas* são altamente sensíveis à inibição por AMN107. Um mutante de Bcr-Abl com substituição de aminoácido no sítio indicado com esferas cor de laranja (i. e., F359) mostra sensibilidade moderada à inibição por AMN107, enquanto variantes mostrando baixa sensibilidade à inibição por AMN107 carregam substituições de aminoácidos mostrados em *verde-claro* (p. ex., Y253). Uma forma mutante de Bcr-Abl resistente a Gleevec é também totalmente resistente a AMN107 (*esferas azuis*, resíduo T315). ("M244" indica que o resíduo normalmente presente na posição 244, que pode ser valina, *não-mostrado*, foi substituído por uma metionina; etc.) (A partir de T. O'Hare, D.K. Walters, E.P. Stoffregen et al., *Cancer Res.* 65:4500-4505, 2005.)



Além disso, completamente inesperado, a utilidade do Gleevec (e, portanto, de outros inibidores de cinase que atuam de forma similar) pode ocasionalmente ser estendida muito além do tratamento das malignidades descritas aqui.

O claro sucesso de Gleevec representou a primeira validação para que o desenho racional de drogas pudesse ter sucesso na produção de agentes que são muito úteis para tratar vários tipos de câncer humano. O fato de que o Gleevec interfere em múltiplas tirosinas cinases foi inicialmente visto como uma desvantagem dessa droga, uma vez que se receava que essa atividade mais ampla levasse a efeitos colaterais não-aceitáveis. Entretanto, com a passagem do tempo, está ficando cada vez mais claro que esses efeitos em múltiplos alvos podem se provar úteis para o tratamento de certas malignidades. Assim, a viabilidade e proliferação de vários tumores depende das ações coordenadas de múltiplas tirosinas cinases, e a habilidade de atacar várias dessas simultaneamente pode um dia vir a conferir grandes vantagens terapêuticas.

Figura 16.29 O uso de Gleevec para tratar tumores do estroma gastrointestinal. O fato de que o Gleevec também mostra atividade inibitória contra a função de tirosina cinase do receptor Kit sugere que ele possa ser útil contra tumores do estroma gastrointestinal (GISTs), nos quais receptores Kit mutantes ativos de forma constitutiva são comumente encontrados. Como visto aqui, este GIST do paciente (*massa vermelha, região pélvica, imagem da esquerda*), que foi visualizado por causa da ingestão de um análogo de glicose marcado, respondeu dramaticamente ao tratamento com Gleevec (*imagem da direita*). (A marcação residual após o tratamento reflete o acúmulo de corante marcado na bexiga do paciente.) Infelizmente, com o passar do tempo, a maioria dos GISTs desenvolvem resistência a Gleevec, de forma que 2,5 anos depois de iniciar o tratamento, cerca de 75% dos tumores não mais respondem bem ao tratamento com Gleevec. (Cortesia de G.D. Demetri.)



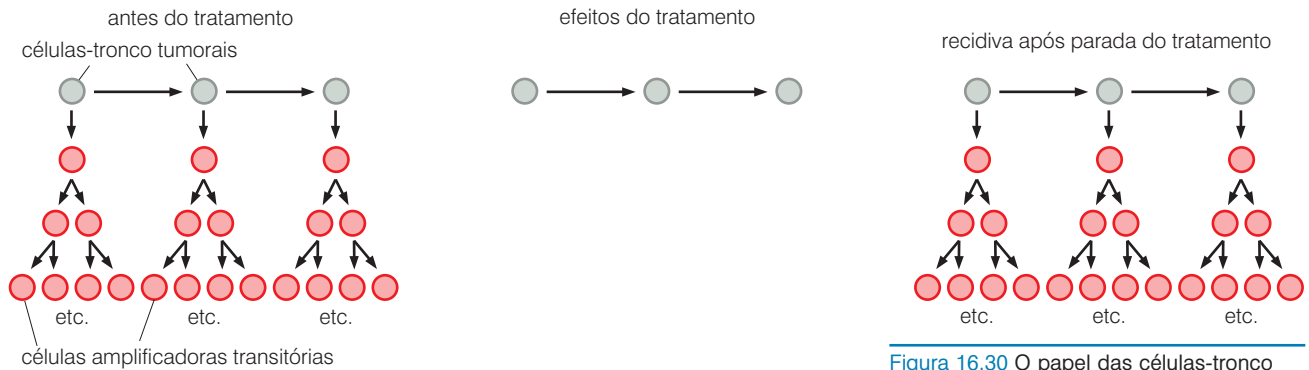


Figura 16.30 O papel das células-tronco tumorais na resposta a tratamentos anticâncer. Enquanto a prova ainda está fragmentária, parece que, em vários tumores, uma pequena proporção da população de células neoplásicas é composta de células-tronco tumorais que se auto-renovam (*cinza*). Isso gera a massa de células cancerosas nos tumores (*cor-de-rosa*), que têm várias das propriedades de células progenitoras normais ou amplificadoras transitórias. Se, como é o caso do Gleevec, uma terapia anticâncer resulta na depleção das células neoplásicas amplificadoras transitórias sem eliminar as células-tronco tumorais, então as últimas podem regenerar o tumor logo depois que a terapia é parada.

Infelizmente, a existência de células-tronco tumorais limita a utilidade do Gleevec. Lembre que a pesquisa sobre cânceres humanos, incluindo tumores hematopoiéticos, carcinomas de mama e tumores de cérebro, revelou que essas células-tronco tumorais freqüentemente constituem apenas uma pequena proporção ($< 5\%$) das células neoplásicas nesses tumores, e que a sua existência pode apenas ser revelada por testes biológicos da sua habilidade em formar tumores ou pelo uso do separador celular ativado por fluorescência (FACS; Seção 11.6). Como acontece, Gleevec é bastante potente em matar células leucêmicas que estão ciclando ativamente (i. e., as células “amplificadoras transitórias” ou “progenitoras”). Entretanto, a maioria das células na população de células-tronco neoplásicas, que está fora do ciclo celular ativo em qualquer ponto único no tempo, tem provado ser bastante resistente ao tratamento com drogas. Conseqüentemente, após a parada do tratamento, tais células-tronco do câncer podem reingressar no ciclo de crescimento e divisão e regenerar a progênie amplificadora transitória, levando ao crescimento de um tumor novamente e recidiva clínica (Figura 16.30). Isso parece explicar por que o tratamento com Gleevec necessita ser crônico e por que, no futuro, o desenvolvimento de drogas precisa ser focalizado em agentes que ataquem no centro dos tumores, destruindo as suas células-tronco (Barra lateral 16.2).

16.12 Antagonistas aos receptores EGF podem ser úteis para tratar uma grande variedade de tipos de tumores

A proposta inicial de desenvolver o Gleevec foi recebida com uma considerável resistência pela companhia farmacêutica na qual ele teve origem, simplesmente porque o mercado para essa droga era julgado muito pequeno para justificar os altos custos para o seu desenvolvi-

Barra lateral 16.2 Células-tronco cancerosas complicam muito a avaliação das terapias anticâncer. A existência de células-tronco cancerosas em vários tumores sólidos tem profundas implicações na avaliação de vários tipos de tratamentos anticâncer. Por exemplo, se uma droga candidata é capaz de eliminar as células-tronco de um tumor enquanto deixa a massa de células cancerosas intacta, a massa tumoral pode primeiramente parecer não-afetada pelo tratamento e começará a encolher-se lentamente apenas quando essas células amplificadoras transitórias entrarem gradualmente em senescência e morrerem nas semanas ou meses seguintes. Embora uma droga como essa possa ter tido sucesso em levar um tumor à morte, ela pode ser julgada como sem valor para um posterior desenvolvimento devido a essas respostas mínimas iniciais ao tratamento.

Na verdade, rituximab, o anticorpo monoclonal anti-CD20 que é usado para tratar tumores de células B (Seção 15.20), mostra exatamente este comportamento: ele elimina as células-tronco tumorais de mielomas múltiplos, mas não as células secretoras de anticorpos mais diferenciadas, muito mais abundantes, que formam massa do tumor.

(Felizmente, no início do seu desenvolvimento, observou-se que o rituximab era eficaz para tratar uma ampla variedade de tumores da linhagem de linfócitos B, e por isso, ele foi aprovado para ser desenvolvido e introduzido na clínica.)

De modo oposto, drogas candidatas que matam apenas as células amplificadoras transitórias criam a ilusão de sucesso: enquanto um tumor encolhe substancialmente em resposta ao tratamento, ele irá recomear rapidamente uma vez que o tratamento for cessado (veja a Figura 16.30). Isso às vezes é chamado de “efeito dandelion” (ou dente de leão), referindo-se ao rápido ressurgimento de ervas daninhas em um campo após a ceifa, que corta as suas folhas, mas deixa as suas raízes intactas.

Apesar de tudo, se uma droga como o Gleevec tem sucesso em gerar remissões clínicas que são duradouras durante vários anos, a sua incapacidade de matar as células-tronco de CML pode representar uma limitação aceitável. De qualquer forma, Gleevec representa o principal triunfo no desenvolvimento de drogas anticâncer, pois é muito superior a todos os tratamentos alternativos dessa doença, de outra forma inexoravelmente progressiva.

mento e testes na clínica. O mesmo não pode ser dito para a classe de drogas desenhadas para inibir o receptor do fator de crescimento epidermal (EGF-R). Carcinomas são tumores comuns, e acredita-se que esse receptor tenha um papel-chave no desenvolvimento de pelo menos um terço deles, sendo frequentemente superexpresso.

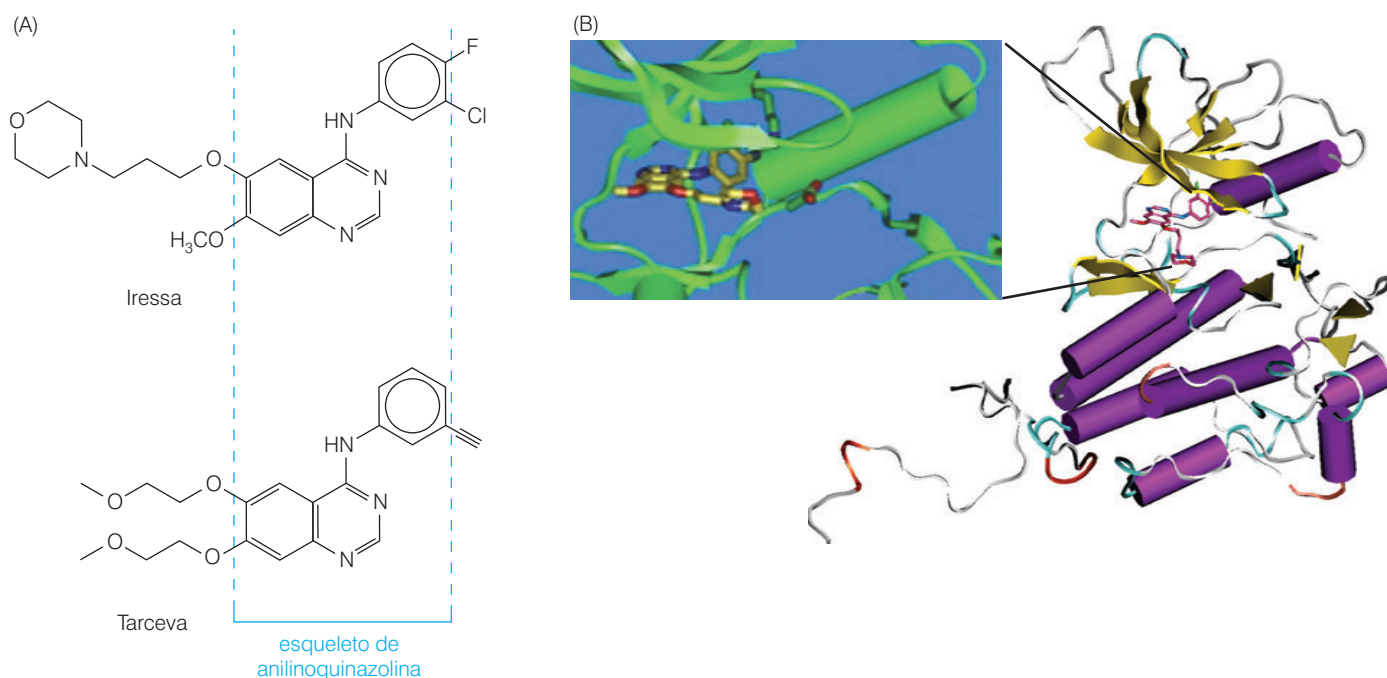
Foi observado que ao menos seis ligantes distintos relacionados a EGF, incluindo o próprio EGF, se ligam e ativam o EGF-R. Isso significa que, mesmo naqueles carcinomas nos quais o EGF-R está presente, mas não superexpresso, ele pode, apesar de tudo, emitir sinais oncogênicos críticos pela ação de alças ativas de sinalização autócrina ou parácrina dirigidas pela presença de um ou mais dos seus ligantes. Além disso, nos carcinomas de mama que superexpressam o receptor HER2/Neu, as ações oncogênicas dessa proteína podem depender da sua habilidade para formar heterodímeros com seu primo, o EGF-R; em tais heterodímeros, o EGF-R pode fosforilar HER2/Neu, ativando assim a sinalização pelo último.

Figura 16.31 Iressa e Tarceva (A) Os dois antagonistas do receptor de fator de crescimento epidermal (EGF-R) são construídos a partir de um esqueleto comum de anilinoquinazolina, que confere a eles uma afinidade ao sítio de ligação de ATP do receptor tirosina cinase. Os grupos químicos laterais que estão ligados a esse esqueleto têm efeitos biológicos, uma vez que as duas drogas têm eficácias diferentes no tratamento de, por exemplo, carcinomas pulmonares de células não-pequenas (NSCLCs). (B) Iressa, também chamada de ZD1839, se liga a uma região muito similar da tirosina cinase de EGF-R, como faz o Tarceva (veja a Figura 16.14). Uma vista ampliada (*esquerda*) do sítio de ligação da droga do domínio da tirosina cinase de EGF-R (*direita*) é mostrada aqui, com a molécula da droga mostrada como uma figura em bastão colorida. Essa ligação é tão forte que 50% da inibição da atividade da enzima TK são conseguidos com uma concentração de cerca de 0,030 μM . (B, cortesia de A.C. Kay, AstraZeneca.)

Os inibidores melhor caracterizados da tirosina cinase de EGF-R são as drogas Iressa, também conhecida como gefitinib e ZD1839, e Tarceva, também chamada de erlotinib e OSI-774 (Figura 16.31A). As duas drogas têm propriedades muito similares, mas não idênticas, e ambas foram mencionadas em várias seções anteriores neste capítulo. Essas duas drogas atuam pelo bloqueio do sítio de ligação a ATP da cinase associada ao receptor (Figura 16.31B; veja também a Figura 16.14).

Uma vez que as células cancerosas são privadas da sinalização por receptores pela inibição do EGF-R, elas deveriam perder o privilégio dos fortes sinais mitogênicos e antiapoptóticos emitidos por esse receptor. Por exemplo, em vários tipos de células epiteliais, o disparo contínuo de EGF-R sustenta a expressão de Bcl-X_L (o primo potencialmente antiapoptótico de Bcl-2) e, atuando via MAPK, dirige a fosforilação e a inativação funcional, acompanhante, da proteína pró-apoptótica Bad.

Como Iressa e Tarceva têm como alvo um receptor da superfície celular, a sua utilidade terapêutica deve ser comparada com aquela dos anticorpos monoclonais que também afetam o seu receptor (Barra lateral 15.4). Em princípio, esses compostos de baixo peso molecular deveriam ser capazes de penetrar em todos os interstícios de um tumor sólido, incluindo aqueles em que as moléculas de anticorpos, muito maiores, podem ter problemas no acesso (Tabela 16.3). Além disso, normalmente é muito mais fácil e de menor custo produzir compostos de baixo peso molecular em escala industrial do que gerar grandes quantidades de anticorpos monoclonais.



Agora existem outras possíveis vantagens de inibidores de tirosinas cinases de baixo peso molecular. Por exemplo, como lemos, em vários carcinomas humanos, formas truncadas de EGF-R, que não têm o ectodomínio normalmente presente, são expressas; esses EGF-Rs mutantes podem sinalizar de maneira constitutiva independente de ligante e, por isso, podem funcionar como oncoproteínas potentes (Figura 5.11). Similarmente, cerca da metade dos gliomas de alto grau (i. e., avançados), chamados glioblastomas multiformes (GBM), exibem superexpressão de EGF-R, e, desses, cerca de 40% apresentam uma forma do receptor que não tem os ectodômios especificados pelos éxons 2 até o 7 da sequência codificante de EGF-R. Tais receptores decapitados não podem ser ligados pelos anticorpos monoclonais (MoAbs) que foram desenvolvidos para reconhecer **epítomos** antigênicos presentes no ectodomínio da proteína receptora normal. Entretanto, essas aberrações não deveriam desviar os inibidores de baixo peso molecular de tirosina cinase, que têm como alvo o domínio citoplasmático emissor de sinal do receptor.

Pesando contra essas drogas, estão as suas propriedades farmacocinéticas: compostos como Iressa podem ter tempos de vida na circulação que são freqüentemente medidos em horas ou dias, enquanto os anticorpos monoclonais podem persistir por semanas na circulação. Como é o caso com todos os agentes como esse, medidas extensivas da concentração em estado estacionário do Iressa na circulação foram adquiridas com o objetivo de assegurar uma dosagem adequada para as células tumorais *in vivo* (Figura 16.32). Quando tomadas diariamente, foi observado que as concentrações efetivas eram mantidas com meias-vidas da droga de 40 horas ou mais.

Iressa tem uma atividade cerca de 50 vezes mais potente contra tirosinas cinases associadas a EGF-R do que contra inúmeras outras tirosinas cinases que foram testadas (veja, por exemplo, a Figura 16.16B), e o seu uso inicial na oncologia clínica foi razoavelmente encorajador. Nos primeiros testes clínicos, 10% dos pacientes com carcinomas pulmonares de células não-pequenas (NSCLCs) mostraram **respostas parciais** à droga, incluindo a estabilização do crescimento tumoral da doença; esses pacientes tiveram a tendência de serem mulheres, não-fumantes e com o subtipo bronquioalveolar de câncer de pulmão. Um estudo paralelo no Japão observou um índice muito mais alto (27%) de respostas parciais a Iressa; essa diferença, que continua a ser observada, parece representar uma diferença na constituição genética das populações japonesa e branca. (Os tumores classificados como NSCLCs têm representado doenças difíceis de serem tratadas, uma vez que 15% dos pacientes sobrevivem durante cinco anos após o diagnóstico inicial.)

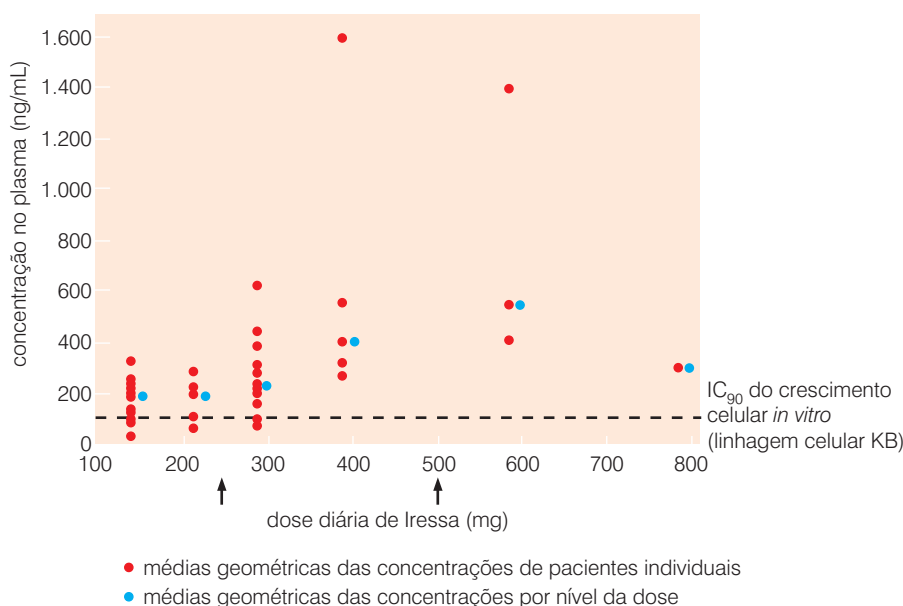


Figura 16.32 Farmacocinética do Iressa Em um teste de Fase I do Iressa, concentrações da droga em estado estacionário no plasma foram alcançadas depois de sete dias de dosagem diária. Houve uma variabilidade substancial entre os pacientes nas concentrações de estado estacionário alcançadas pelas doses diárias diferentes (*círculos vermelhos*); a média geométrica da concentração dentro desse grupo está indicada pelos *círculos azuis*. A concentração de Iressa necessária para inibir 90% da proliferação das células KB do carcinoma epidermóide humano (i. e., IC₉₀) crescidas *in vitro* é dada pela linha pontilhada (~100 ng/mL). Portanto, até mesmo a mínima dose clínica administrada produziu concentrações médias mais altas no plasma. Doses diárias de 250 e 500 mg/dia (*setas*) foram, por fim, escolhidas para os testes subsequentes de Fase II. (A partir de R.S. Herbst, A.M. Maddox, M.L. Rothenberg et al., *J. Clin. Oncol.* 20:3815-3825, 2002.)

Esses resultados foram gratificantes, mesmo por terem apenas representado respostas claras em pacientes que de outra forma teriam poucas, se alguma, alternativas de tratamento. Entretanto, as ações sinérgicas esperadas de Iressa com agentes quimioterapêuticos padrão não proveram qualquer vantagem na sobrevivência sobre a quimioterapia-padrão sozinha para o tratamento de tumores NSCLC, que constituem quase 80% dos casos de câncer de pulmão nos Estados Unidos. Quando utilizado sozinho, Tarceva (mas não Iressa) aumentou o tempo de sobrevivência geral dos pacientes cujos NSCLCs se tornaram refratários ao tratamento por drogas quimioterapêuticas padrão.

Algumas lições importantes foram aprendidas a partir desses testes iniciais, as quais podem melhorar as respostas em testes clínicos subsequentes dessas e de outras drogas similares: primeiro, a contribuição específica do EGF-R para o crescimento do tumor sob tratamento não foi documentada. Portanto, índices de resposta muito maiores podem ter resultado a partir da estratificação dos pacientes de NSCLC e limitado o uso de Iressa apenas para aqueles tumores que têm assinaturas moleculares específicas.

Segundo, a possível contribuição de outras proteínas mutantes para a sinalização mitogênica e antiapoptótica não foi avaliada. Existe evidência, por exemplo, de que tumores negativos para PTEN (que têm a via da cinase PI3 hiperativa; veja a Seção 6.6) não respondem a Iressa, e de que inibidores de Akt/PKB (o beneficiário *downstream* da inativação de PTEN) podem agir sinérgicamente com Iressa e parar o crescimento tumoral. Terceiro, relativamente poucos estudos pré-clínicos foram realizados com o objetivo de otimizar a dosagem e a programação do tratamento com essa droga.

Em 2004, quatro anos depois que os resultados dos testes clínicos iniciais com Iressa foram reportados pela primeira vez, duas colaborações de pesquisa em Boston forneceram independentemente uma explicação molecular para as respostas observadas ao Iressa. Previamente, o estado do receptor EGF em células NSCLC foi avaliado, determinando se ele era superexpresso e se estava presente na forma truncada, ativa de maneira constitutiva, como é o caso dos glioblastomas humanos. Entretanto, nos estudos de 2004, investigadores fizeram o sequenciamento detalhado das fases de leitura do gene que codifica para EGF-R nos pacientes de NSCLC que foram tratados com Iressa.

Muito dramaticamente, foi observado que quase todo o pequeno grupo (~10% do total) de pacientes de NSCLC que responderam bem ao tratamento com Iressa (Figura 16.33A) produzia células tumorais que apresentavam EGF-R alterados estruturalmente. Tais receptores mutantes não foram encontrados entre os tumores que falharam em responder a Iressa, incluindo aqueles que expressaram níveis elevados desse receptor. As mutações responsáveis criaram substituições de aminoácidos e pequenas deleções nos domínios cinase (Figura 16.33B), em vez de deleções maiores do ectodomínio do receptor, tipicamente encontradas nos glioblastomas. Similarmente, os tumores em 5 dos 7 pacientes que responderam ao tratamento com Tarceva expressaram tais receptores mutantes. Por razões desconhecidas, esses receptores mutantes mostraram padrões distintos de fosforilação da tirosina das suas caudas C-terminais (Seção 6.3) e estimularam seletivamente as vias Akt/PKB e STAT5 *downstream*, deixando a via de sinalização MAPK sem ser afetada.

Essas observações forneceram evidências convincentes de que EGF-R teve um papel principal em direcionar o crescimento desse pequeno grupo de tumores. Além disso, eles demonstraram o valor da estratificação (i. e., subclassificação) de tumores usando marcadores moleculares quando tratavam populações de pacientes com terapêuticos moleculares específicos, como Iressa e Tarceva. Entretanto, esses experimentos não revelaram por que Iressa e Tarceva tiveram efeitos tão fortes sobre esses tumores em particular (mas veja a Barra lateral 16.3).

Ainda, virtualmente todos esses sucessos tiveram vida curta, e a maioria dos pacientes reincidiu em 6 a 18 meses, tendo desenvolvido resistência ao tratamento com a droga. Isso ressalta, mais uma vez, a necessidade de agentes alternativos para tratar receptores resistentes a drogas e da terapia com múltiplas drogas, nas quais várias drogas com efeitos sinérgicos são apli-

cadras simultaneamente. Na verdade, várias moléculas de drogas que são distintas estruturalmente das anilinoquinazolininas (Figura 16.31A) são capazes de desligar os EGF-Rs resistentes a Iressa e Tarceva, fornecendo esperança para aqueles pacientes que reincidiram após um tratamento prolongado com uma ou outra dessas duas drogas.

16.13 Inibidores de proteassomas geram benefícios terapêuticos inesperados

O acaso tem um papel proeminente não-comum no mundo da descoberta das drogas. Em uma ocasião, o desenvolvimento de uma droga anticâncer é lançado como parte de um programa de desenho racional de drogas e, no final das contas, gera um agente que se revela altamente útil, embora por razões absolutamente não-relacionadas àquelas que inspiraram o

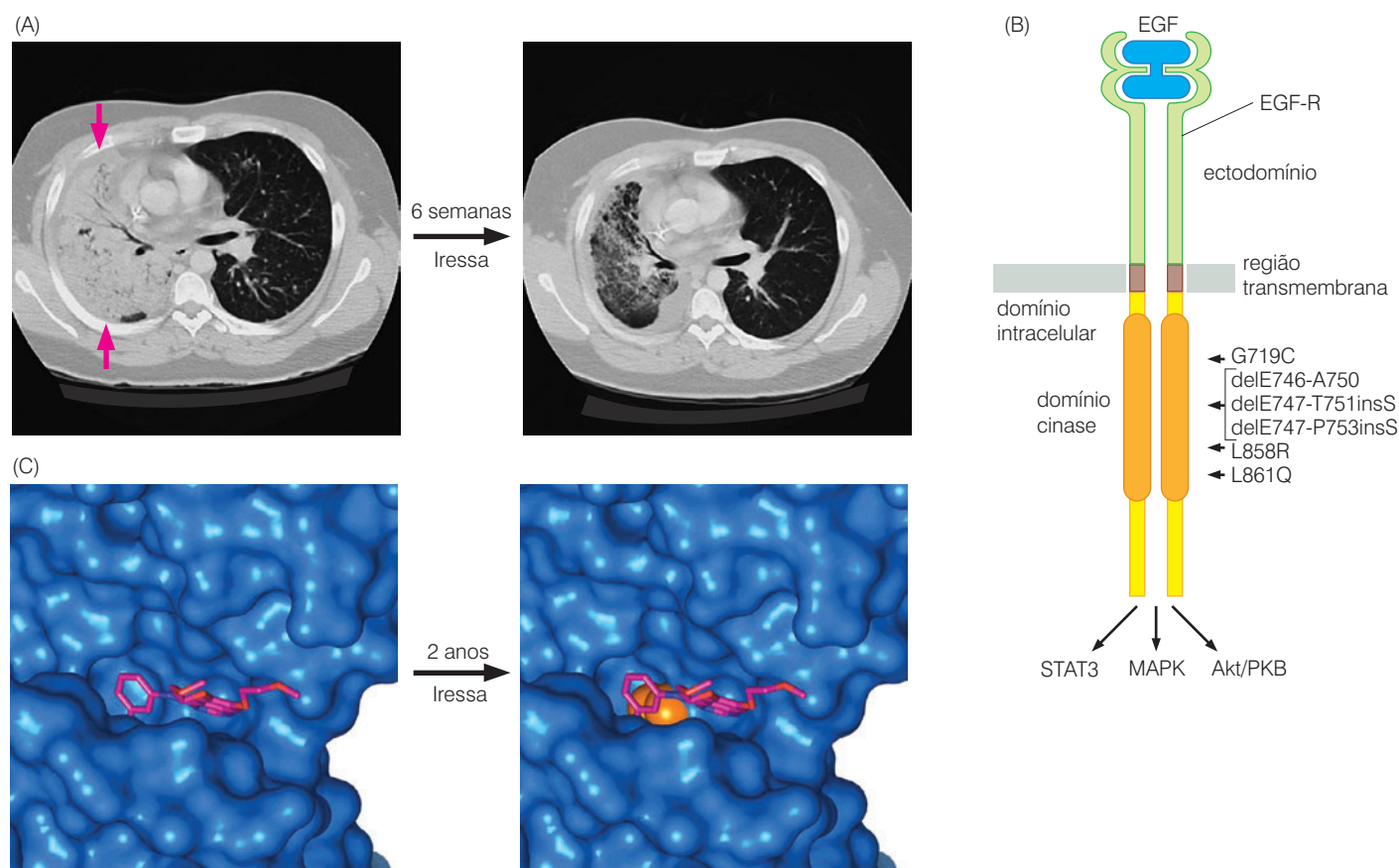


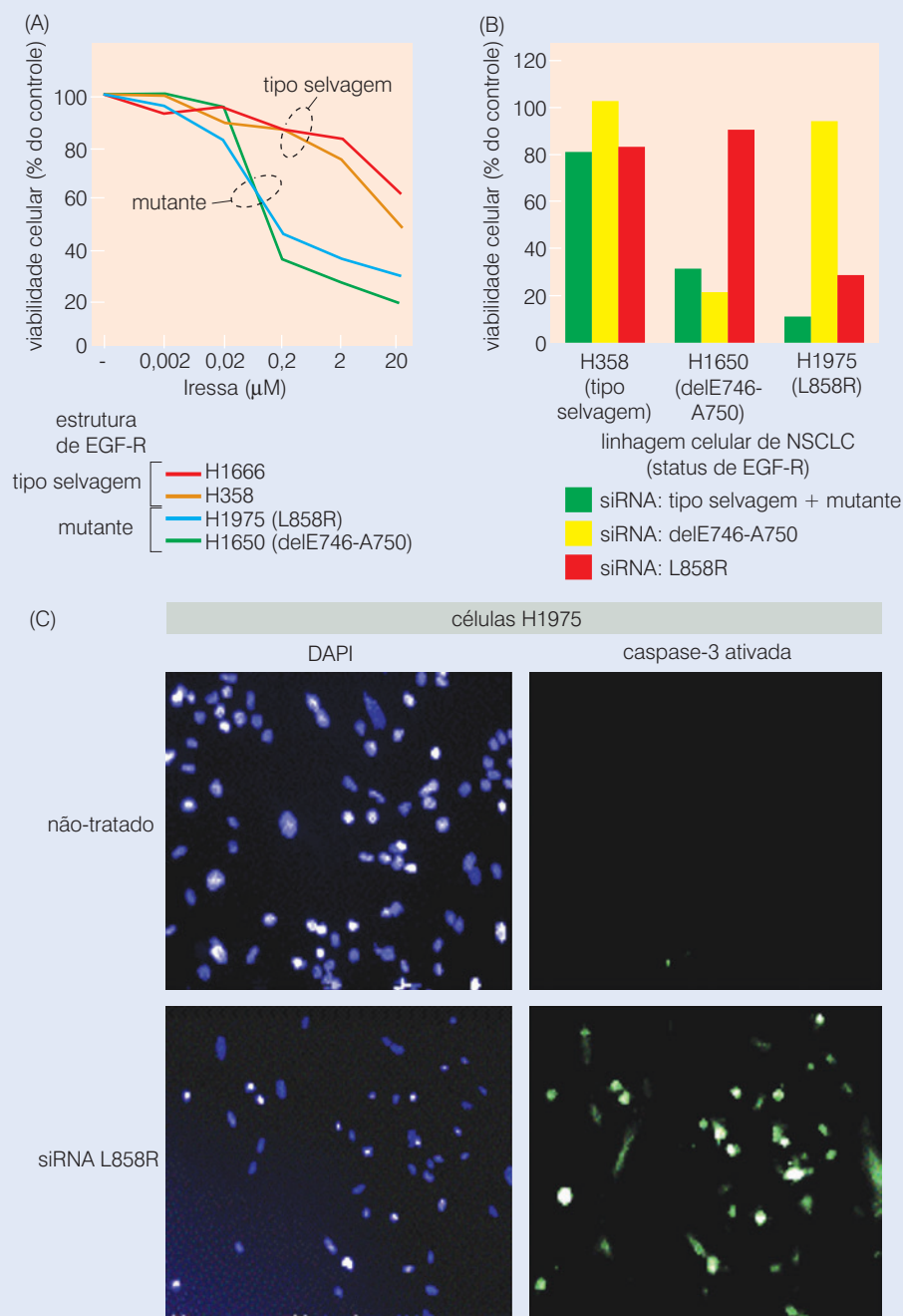
Figura 16.33 Responsividade dos NSCLCs ao tratamento com Iressa (A) Uma minoria de pacientes com câncer pulmonar de células não-pequenas (NSCLCs) refratário – tumores que falharam na resposta ou não respondem mais à quimioterapia-padrão – mostraram uma resposta dramática ao tratamento com Iressa. Essas imagens de raios X por tomografia computadorizada revelaram uma grande massa no pulmão direito (à esquerda) de um paciente que sofreu uma dramática regressão depois de seis semanas de tratamento com Iressa (à direita). (B) Foi observado que uma proporção substancial de NSCLCs que responde ao tratamento a Iressa carrega mutações no gene que codifica para o EGF-R que afetam o domínio citoplasmático do receptor e incluem tanto deleções (“del”) como mutações pontuais. Essas alterações na estrutura de EGF-R desregulam e ativam a função de tirosina cinase do receptor, estimulando, com isso, as vias de sinalização Akt/PKB e STAT *downstream*, que protegem essas células tumorais da apoptose. (C) Finalmente, pacientes

com alguma das mutações indicadas retornam da terapia com Iressa ou Tarceva. Como é o caso com a resistência adquirida ao Gleevec (veja a Figura 16.26B), os EGF-Rs nesses pacientes NSCLC frequentemente adquirem alterações estruturais que bloqueiam a ligação da droga. Aqui, um paciente, cujo EGF-R associado a tumor mostrou uma mutação delE747-P753insS (B), beneficiou-se de uma remissão conseguida pela terapia com Iressa; depois de dois anos, entretanto, esse tumor cresceu novamente. O sequenciamento do gene EGF-R no tumor recidivante mostrou que o sítio de ligação presente no receptor do tipo selvagem (à esquerda) estava parcialmente obstruído por uma substituição de treonina por metionina (à direita), fazendo com que a cadeia lateral volumosa da metionina (esfera cor-de-laranja) bloqueasse a ligação de Iressa. (A e B, a partir de T.J. Lynch, D.W. Bell, R. Sordella et al., *N. Engl. J. Med.* 350:2129-2139, 2004; C, a partir de s. Kobayashi, T.J. Boggon, T. Dayaram et al., *N. Engl. J. Med.* 352:786-792, 2005.)

Barra lateral 16.3 O vício por oncogene pode explicar como Iressa e Tarceva tiveram sucesso em eliminar NSCLCs. Os EGF-Rs mutantes que são encontrados em certos NSCLCs fazem que as células desses tumores em particular sejam cerca de 100 vezes mais sensíveis ao Iressa do que os tumores que expressam os receptores do tipo selvagem (Figura 16.34A). Além disso, a concentração atual da droga no plasma de pacientes que estão sendo tratados diminuiu para uma escala que permite o funcionamento de tal inibição seletiva.

O mecanismo de “vício por oncogene” pode explicar os efeitos seletivos de ambos os inibidores de EGF-R sobre tumores que expressam EGF-Rs mutantes. O vício por oncogene refere-se ao fato de que certas células cancerosas parecem ser particularmente dependentes de certos oncogenes ou oncoproteínas para o seu crescimento e sobrevivência, enquanto outros tumores podem perder esse gene ou proteína sem sofrer qualquer consequência óbvia.

Para explicar tal comportamento, podemos imaginar que alguns oncogenes sejam geralmente deletérios quando expressados em células do tipo selvagem, mas são realmente benéficos em células



las que previamente adquiriram certos alelos mutantes. Um bom exemplo é fornecido pelo oncogene *myc*, que tem efeitos pró-apoptóticos sobre as células, a menos que elas tenham sido protegidas de apoptose por algum outro alelo antiapoptótico previamente adquirido (p. ex., um oncogene *ras*); na presença da mutação antiapoptótica, os efeitos fortemente mitogênicos do oncogene *myc* então se tornam aparentes. Portanto, as células tumorais que carregam tanto o oncogene *ras* como o *myc* se comportariam como se estivessem “viciadas” na expressão de *ras*, uma vez que elas morreriam rapidamente por apoptose se estivessem desprovidas do oncogene *ras*.

Conseqüentemente, no início da progressão do tumor, a aquisição de um certo oncogene, como um gene EGF-R mutante, poderia criar um meio celular que permite a aquisição de outros oncogenes (ou perda de genes supressores de tumor) que iriam, por outro lado, ser altamente deletérios para as células tumorais. Se o receptor mutante agora é perdido, então os efeitos deletérios desses outros oncogenes, notavelmente aqueles que favorecem a apoptose, se tornariam aparentes e resultariam na perda rápida da viabilidade celular.

No caso de NSCLC, aqueles tumores que carregam receptores mutantes podem vir a ficar dependentes dos disparos por seus EGF-Rs mutantes para sobreviver e proliferar; isto é, eles são “viciados” nos receptores mutantes. De modo oposto, os NSCLCs em número muito maior expressando EGF-R do tipo selvagem podem ter desenvolvido meios alternativos para conseguir sinais mitogênicos e de sobrevivência, como é, sem dúvida, sugerido pela observação do disparo independente de receptor das vias MAPK e PI3K em alguns cânceres de pulmão.

Esse cenário também é sustentado por experimentos usando siRNAs para inibir a expressão de receptores do tipo selvagem ou mutantes: células NSCLC com EGF-R mutantes morrem rapidamente, enquanto aquelas que exibem receptores do tipo selvagem são afetadas apenas levemente (Figura 16.34B e C). Como conseqüência, a morte de células cancerosas com EGF-Rs mutantes não é devida a algo desconhecido, efeito inespecífico de Iressa ou Tarceva, mas, em vez disso, é causada diretamente pela perda dos sinais benéficos liberados por esses receptores. Além disso, experimentos como esse sugerem que os inibidores de EGF-R possam ter efeitos muito maiores sobre os NSCLCs expressando receptores do tipo selvagem se eles são aplicados junto com uma segunda droga que iniba uma outra via de sinalização redundante funcionalmente, como aquela controlada por PI3K.

Figura 16.34 Efeitos de siRNAs para suprimir a expressão de EGF-R Não está claro por que as células de carcinoma pulmonar de células não-pequenas (NSCLC) que carregam receptores EGF alterados estruturalmente (veja a Figura 16.33) são especialmente responsivas a terapia com Iressa ou Tarceva. (A) Quando cultivadas *in vitro*, duas linhagens celulares de NSCLC que superexpressam EGF-R estruturalmente normal (i. e., tipo selvagem) são relativamente resistentes ao tratamento com Iressa (*cor-de-laranja, vermelho*), enquanto duas linhagens NSCLC expressando ou uma proteína receptora com uma substituição de aminoácido (*azul*) ou uma parcialmente deletada (*verde*) são cerca de 100 vezes mais sensíveis à morte. (B) Os mecanismos biológicos dessas diferenças poderiam ser examinados privando-se as linhagens celulares de NSCLC de EGF-R pela expressão de siRNAs nessas células; esses siRNAs causam a degradação do mRNA para EGF-R. Células H358 (três barras da esquerda) expressando EGF-R do tipo selvagem não foram relativamente afetadas por siRNAs direcionados contra todas as formas do receptor (*verde*) ou contra as duas formas mutantes (*amarelo, vermelho*). Entretanto, um siRNA direcionado especificamente contra o mRNA que codifica para uma forma deletada do receptor (DelE746; *amarelo*) causou a perda da viabilidade em cerca de 80% das células NSCLC expressando esse receptor mutado (*barras centrais*), ao passo que não teve efeito nas células contendo um receptor com uma substituição de aminoácido (*vermelho, barras centrais*). Ao contrário, a perda de viabilidade foi observada quando um siRNA direcionado contra o receptor com a substituição de aminoácido (*vermelho*) foi expresso em células que expressam esse receptor mutante em particular (*barras da direita*), mas não quando um siRNA direcionado contra o mutante com deleção foi usado. No caso de ambas as linhagens celulares mutadas, o siRNA direcionado contra todas as formas do receptor (*barras em verde*) também causou morte celular alastrada. Portanto, as duas linhagens celulares de NSCLC com receptores mutados são dependentes (“viciados em”) da função de EGF-R, enquanto as células NSCLC com receptor do tipo selvagem mostraram virtualmente nenhuma dependência da função contínua de EGF-R. (C) A perda das células viáveis após o tratamento com siRNA vista no painel B é dada especificamente por uma indução da apoptose, como revelado por imunocoloração de células fixadas com um anticorpo reativo com caspase-3 ativada, clivada. Células NSCLC foram alternativamente coradas com 4',6'-diamidino-2-fenilindol (DAPI) para revelar o núcleo e, assim, o número de células. (A partir de R. Sordella, D.W. Bell, D.A. Haber e J. Settleman, *Science* 305:1163-1167, 2004.)

seu desenvolvimento em primeiro lugar. Isso é melhor descrito pelo desenvolvimento da droga conhecida como Velcade, também chamada de PS-341 e bortezomib (Figura 16.35A).

Em várias ocasiões por todo este livro, vimos como os níveis de proteínas reguladoras chave de células são determinadas pelo balanço entre a sua síntese e a sua degradação. Muito dessa degradação é mediada pelo sistema ubiquitina-proteassomo (Barra lateral 7.8). Lembre que a marcação de uma proteína por poliubiquitilação resulta no seu transporte para os proteassomos e na sua degradação nessas máquinas intracelulares.

O fenômeno de **caquexia** associada ao câncer estimulou inicialmente o interesse por inibidores da função dos proteassomas. A caquexia ocorre tarde na progressão do tumor e representa uma perda progressiva de tecidos dos pacientes com câncer por mecanismos que ainda não estão bem-entendidos. O uso de um inibidor de proteassoma foi especulado quanto a ser útil no retardo de uma degradação alastrada de proteínas que ocorre nos tecidos de pacientes caquéticos. Enquanto no mínimo cinco classes distintas de inibidores de proteassomas têm sido desenvolvidas, a maioria dessas foi abandonada por causa de instabilidade metabólica, ausência de especificidade ou ligação irreversível e inativação dos proteassomas. Velcade, um desses inibidores de proteassomas, é um ácido borônico dipeptídico que foi desenhado como um inibidor específico da atividade de **peptidase** (clivagem de peptídeo) presente no centro 20S do proteassoma (Figura 16.35B). Ele tem uma potência extraordinária, uma vez que é capaz de inibir 50% da atividade quimiotríptica dos proteassomos em uma concentração (i. e., seu K_i) de apenas 0,6 nM. Funcionando como um inibidor competitivo dessa atividade enzimática, Velcade diminui o fluxo de substratos pelos proteassomas, que logo começam a se tornar obstruídos e disfuncionais.

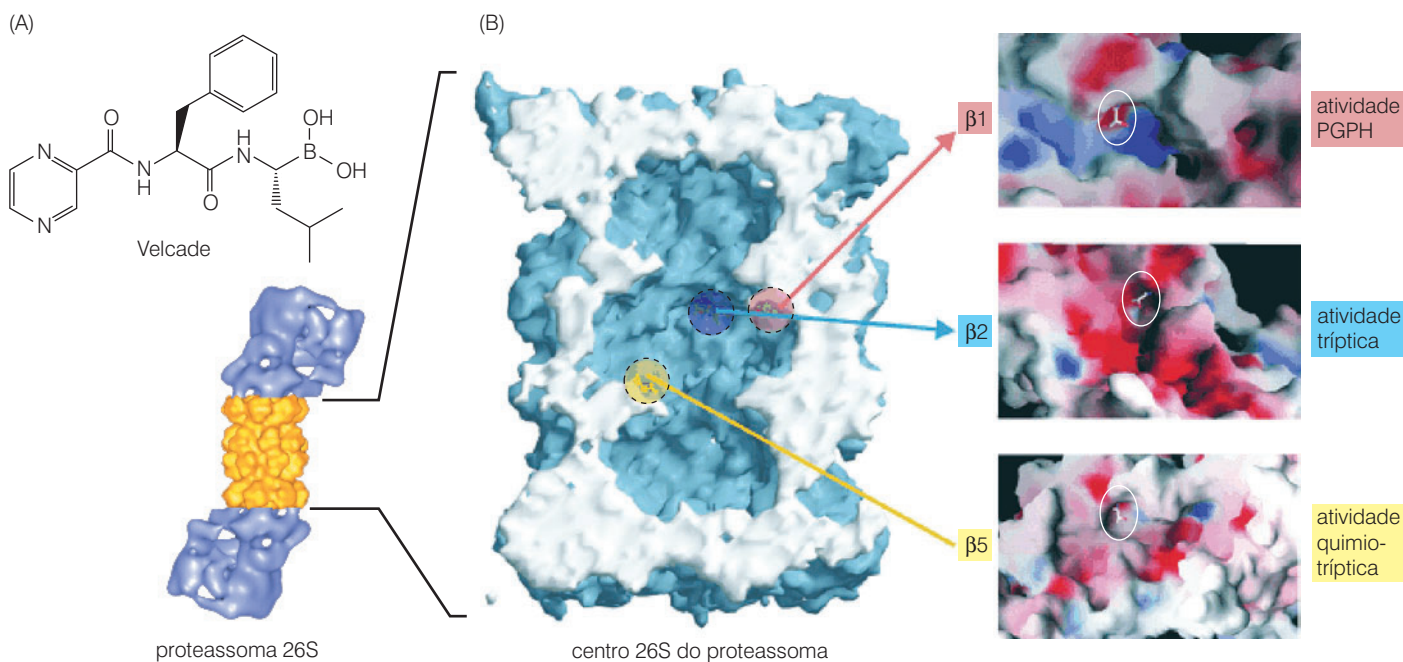
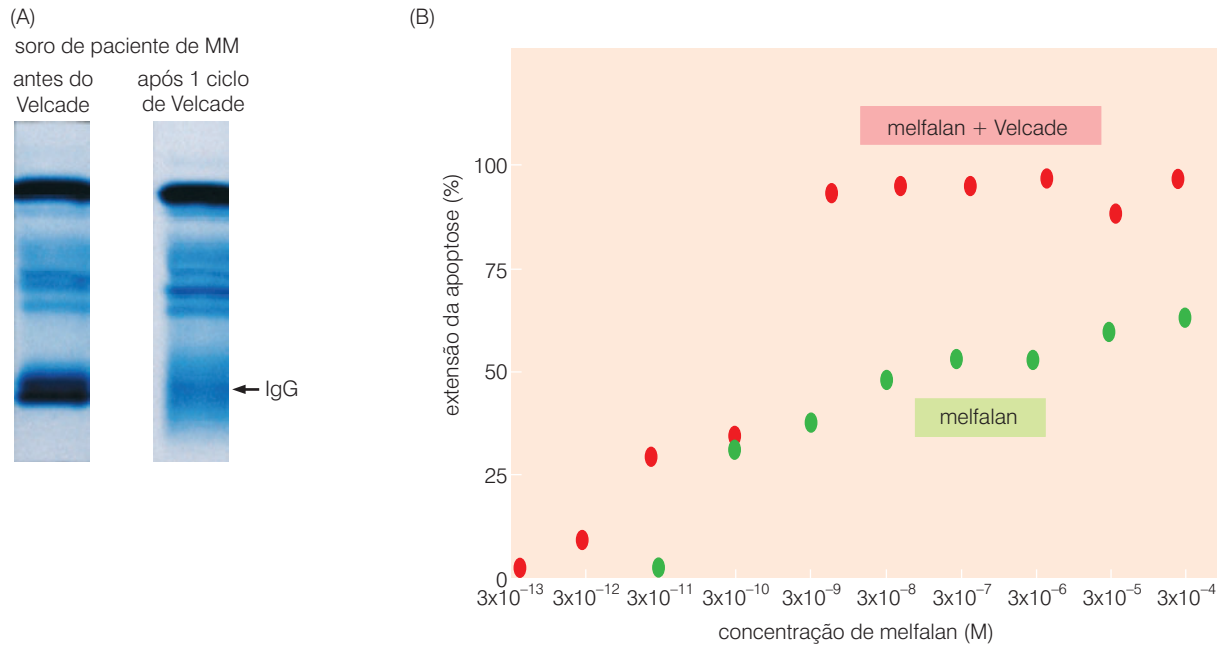


Figura 16.35 Velcade e o seu efeito sobre proteassomas (A) A estrutura química do Velcade revela a presença, não-comum entre drogas, de um átomo de boro. Sabe-se que os ácidos borônicos peptídicos como o Velcade se ligam ao sítio ativo de serinas proteases da classe das quimiotripsinas (que clivam substratos protéicos adjacentes aos resíduos de fenilalanina e tirosina) mimetizando o substrato normal dessas enzimas. Isso sugeriu que tais compostos poderiam inibir o sítio ativo semelhante à quimiotripsina no centro 20S do proteassoma. (B) Uma secção transversal (centro) pelo miolo central (20S) do proteassoma de levedura (à esquerda; veja a Figura 7.27) revela a localização de três sítios catalíticos distintos, envolvendo as subunidades $\beta 1$, $\beta 2$ e $\beta 5$, que são responsáveis pela sua atividade

proteolítica PGPH (peptidil-glutamil-peptídeo hidrolizante; *cor-de-rosa*), tríptica (*azul-claro*) e quimiotríptica (*amarelo-claro*), respectivamente. Velcade mostra uma forte preferência por inibir a atividade quimiotríptica de $\beta 5$, cuja estrutura detalhada é vista aqui (à direita, abaixo); uma fraca interação com a atividade tríptica de $\beta 2$ (à direita, no meio); e nenhuma interação com a atividade PGPH de $\beta 1$ (à direita, acima). O resíduo nucleofílico chave treonina presente em cada um desses sítios catalíticos é mostrado como uma figura em bastão (*branca, dentro das formas ovais*); os aminoácidos básicos na fenda catalítica (à direita) estão mostrados em azul, os aminoácidos ácidos estão mostrados em vermelho e os resíduos hidrofóbicos estão mostrados em branco. (B, a partir de M. Groll, M. Bochtler, H. Brandstetter et al., *ChemBiochem* 6:222-256, 2005.)



Subseqüentemente, foi observado que a degradação mediada por proteassomas tinha um papel crítico na regulação de várias vias-chave de sinalização celular, ampliando os horizontes dos que desenvolveram o Velcade. Como foi observado que outros inibidores de proteassomas eram especialmente potentes para matar uma variedade de células cancerosas em cultura, o Velcade foi utilizado nos testes da fase inicial (i. e., Fase I) para tratar pacientes com câncer que falharam com outras terapias. Aqueles com tumores sólidos mostraram poucas respostas evidentes. Entretanto, entre um grupo de pacientes com malignidades hematológicas, havia um sofrendo de mieloma múltiplo (MM), uma malignidade da linhagem de células B na qual um único clone de células plasmáticas produtoras de anticorpos domina a medula óssea (veja a Figura 2.19A). As células do mieloma criam lesões ósseas osteolíticas, levando a fraturas, e, por fim, tomam conta dos componentes celulares restantes da medula, resultando em imunodepressão severa e, tipicamente, morte a partir de infecção devastadora. A sobrevivência após o diagnóstico inicial em geral é de 3 a 5 anos. O mieloma carregado por esses pacientes tratados inicialmente mostrou uma dramática regressão (veja, por exemplo, a Figura 16.36A), o que logo levou à inclusão de outros pacientes com mieloma nesses testes de Fase I e, finalmente, a testes clínicos em larga escala, nos quais os pacientes com mieloma eram tratados com Velcade.

Em um teste clínico subseqüente de Fase I com um grupo de pacientes com mielomas múltiplos sofrendo da doença rapidamente progressiva, o Velcade mostrou “respostas objetivas” claras na diminuição da progressão da doença em 55% dos pacientes e parou a progressão em outros 25%. Em um teste clínico de Fase II, foi dado Velcade para a metade dos pacientes, enquanto para a outra metade, que serviu de controle, foi dado dexametasona, um tratamento-padrão para mieloma múltiplo. Na grande maioria desses pacientes, já haviam falhado as quimioterapias comumente utilizadas para mieloma. Esse teste foi parado prematuramente em 2003, porque a doença mostrou ou uma “resposta completa (CR)” em um pequeno número de pacientes (i. e., as células do mieloma desapareceram completamente do sangue por um período de no mínimo seis semanas) ou uma “resposta parcial (PR)” (no mínimo 50% de redução nos anticorpos secretados por células de mieloma no sangue e 90% de redução dessa proteína na urina durante o mesmo período) em 35% dos pacientes tratados com Velcade, mostrando, dessa forma, uma superioridade clara aos tratamentos existentes. Como consequência, foi permitido que os pacientes controle também tomassem a droga. Em um teste subseqüente, a progressão do mieloma para um estágio mais alto da doença ocorreu em um tempo médio de sete meses nos pacientes tratados com Velcade comparados com os três meses em um grupo controle estudado em paralelo. Além disso, estudos pré-clínicos indicaram que as doses relativamente baixas do Velcade podem sensibilizar as células do mieloma para drogas quimioterapêuticas, tornando as últimas muito mais efetivas (veja a Figura 16.36B).

Figura 16.36 Mieloma múltiplo e os efeitos biológicos do Velcade (A) O Velcade pode ter efeitos profundos sobre o conteúdo celular da medula e, portanto, sobre a composição das moléculas de anticorpo no sangue. Em um paciente com mieloma múltiplo (MM), após um ciclo de oito doses de Velcade, as células neoplásicas do plasma na medula diminuíram de 41% de células totais para 1%. Ao mesmo tempo, houve uma acentuada diminuição no nível das espécies únicas de imunoglobulinas γ (IgG) produzidas por essas células de mieloma. Como visto aqui, na eletroforese em gel, o pequeno número de espécies de IgG presentes antes do tratamento (indicativo de um tumor monoclonal, à esquerda) resolveu-se no meio do padrão policlonal, de migração heterogênea, de IgGs que estão presentes na circulação de um indivíduo saudável (à direita; veja também a Figura 2.19A). (B) Melfalan, uma droga quimioterapêutica alquilante usada rotineiramente para tratar MM, foi adicionada em várias concentrações a uma linhagem celular MM *in vitro*, sozinha (verde) ou na presença de uma dose não-tóxica de Velcade (vermelho). Na presença do Velcade, melfalan foi capaz de induzir uma ampla apoptose em concentrações de aproximadamente 3 nM, ao passo que quando aplicado sozinho, foi incapaz de induzir esse grau de apoptose, até mesmo em concentrações muito mais altas. (A, a partir de R.Z. Orlowski, T.E. Stinchcombe, B.S. Mitchell et al., *J. Clin. Oncol.* 20:4420-4427, 2002; B, a partir de M.H. Ma, H.H. Yang, K. Parker et al., *Clin. Cancer Res.* 9:1136-1144, 2003.)

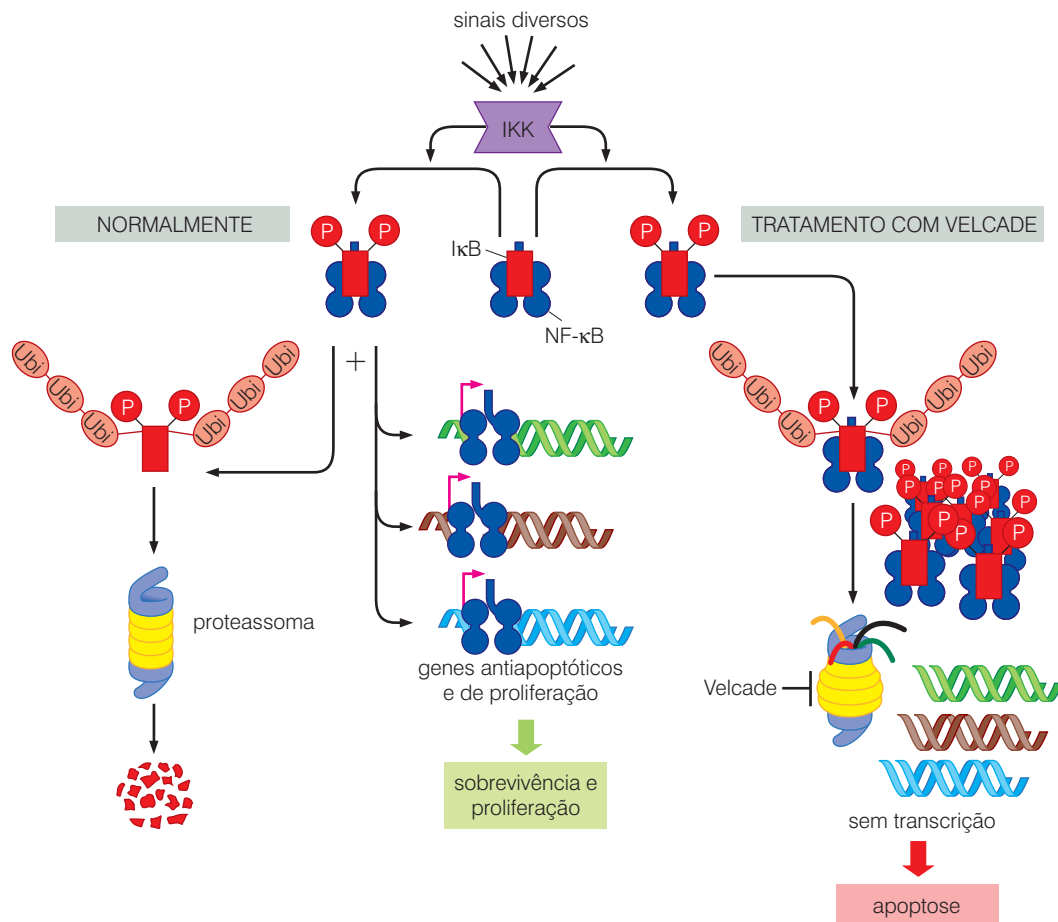


Figura 16.37 Mecanismo de ação do Velcade A inibição da sinalização pelo fator de transcrição NF- κ B contribui significativamente para a habilidade do Velcade em induzir a apoptose de células do mieloma dentro da medula óssea. Em células normais (à esquerda), uma variedade de sinais de estresse, mitogênicos e tróficos (sobrevivência) ativa a cinase IKK (IKK; roxo); sinalização similar ocorre nas células de mieloma, assim como em uma variedade de outros tipos de células cancerosas, nas quais vários mecanismos são responsáveis pela ativação constitutiva de IKK. Uma vez ativa, IKK começa a fosforilar I κ B (vermelho), o inibidor de NF- κ B. Essa fosforilação faz com que I κ B se torne ubiquitilado (à esquerda) e degradado nos proteassomas (à esquerda, abaixo). Na ausência de I κ B (centro), NF- κ B (azul) está livre para se mover para o núcleo, onde ele ativa a expressão de um amplo

eleitorado de genes de proliferação e antiapoptóticos. Na presença do Velcade (à direita), a fosforilação e ubiquitilação de I κ B ocorrem normalmente, mas I κ B ubiquitilada não pode ser degradada nos proteassomas, pois a última tornou-se abarrotada com polipeptídeos não-processados. Isso leva a um acúmulo de I κ B no citoplasma e ao seqüestro contínuo de NF- κ B pelas moléculas de I κ B que foram montadas (à direita). Como consequência, NF- κ B não pode mover-se para o núcleo e ativar a expressão do seu eleitorado de genes-chave antiapoptóticos. Isso inclina a balança reguladora nas células de mieloma em favor da apoptose, resultando na morte dessas células. O tratamento com Velcade pode, adicionalmente, levar ao acúmulo de moléculas de p53, que também são suspeitas de contribuir para a apoptose de células de mieloma tratadas (não-mostrado).

Na verdade, a inclusão de um paciente com mieloma em um teste clínico inicial foi acidental. Acreditava-se que o mieloma múltiplo era um alvo atrativo para o tratamento por um inibidor de proteassoma por causa da atividade elevada conhecida da via de sinalização NF- κ B nas células de mieloma e da sua importância fisiológica no direcionamento da sobrevivência e proliferação dessas células. Na seção 6.12, notamos que os fatores de transcrição NF- κ B são normalmente seqüestrados no citoplasma por uma classe de inibidores chamados de I κ Bs (inibidores de NF- κ B). Quando esses I κ Bs são fosforilados por um grupo de cinases especializadas chamadas de cinases I κ B, ou simplesmente IKKs, os I κ Bs sofrem poliubiquitilação e degradação; isso libera os NF- κ Bs, permitindo que eles migrem para o núcleo, onde ativam inúmeros genes antiapoptóticos, assim como genes promotores do crescimento (Figuras 16.37 e 16.38; veja também as Figuras 6.29A e 11.37B).

Como várias outras proteínas poliubiquitiladas, os I κ Bs acabam sendo degradados nos proteassomas. Portanto, inibindo a ação dos proteassomas, os I κ Bs deveriam ser protegidos da degradação, sobreviver no citoplasma e continuar a seqüestrar os NF- κ Bs, bloqueando assim a translocação

nuclear de NF- κ B e a ativação da transcrição. Sabia-se que o NF- κ B nuclear funcionalmente ativo é importante para a indução da expressão de IL-4 e IL-6, duas interleucinas que operam como fatores autócrinos importantes necessários para o crescimento e sobrevivência de células de mieloma. Além disso, como foi estudado mais tarde, NF- κ B tem um papel proeminente na sinalização antiapoptótica em vários tipos de células cancerosas; então, a perda de atividade de NF- κ B pode muito bem inclinar a balança de sinalização entre essas células em direção da apoptose. Mais especificamente, uma vez que as células cancerosas perdem as proteínas potencialmente antiapoptóticas Bcl-2, cIAP-2 e XIAP (cujas expressões são induzidas por NF- κ B), elas estão em sério perigo de deslizar para dentro do abismo apoptótico.

Entretanto, tudo isso não explica por que o Velcade é muito mais potente contra mielomas do que outros tumores que dependem da sinalização de NF- κ B para protegê-los da apoptose. Uma possível pista vem das observações de que o crescimento e a viabilidade das células de mieloma são altamente dependentes da sua habilidade de sintetizar VEGF (fator de crescimento do endotélio vascular; Seção 13.1) e moléculas de adesão; as últimas permitem que as células de mieloma se liguem às células-tronco da medula óssea (BMSCs), com as quais as células de mieloma estabelecem interações heterotípicas muito importantes. Os genes que codificam essas proteínas estão todos sob o controle de NF- κ B.

Além disso, as células malignas do plasma que formam o tumor mieloma sintetizam e secretam grandes quantidades de proteínas – moléculas de anticorpos. Uma certa proporção dessas moléculas pode ser rotineiramente degradada nos proteassomas por causa do dobramento incorreto ou de outros contratempos que ocorrem durante a sua montagem. Como consequência, as células do plasma podem ser especialmente sensíveis a inibidores de degradação das proteínas e podem se tornar rapidamente saturadas com tais moléculas protéicas defectivas.

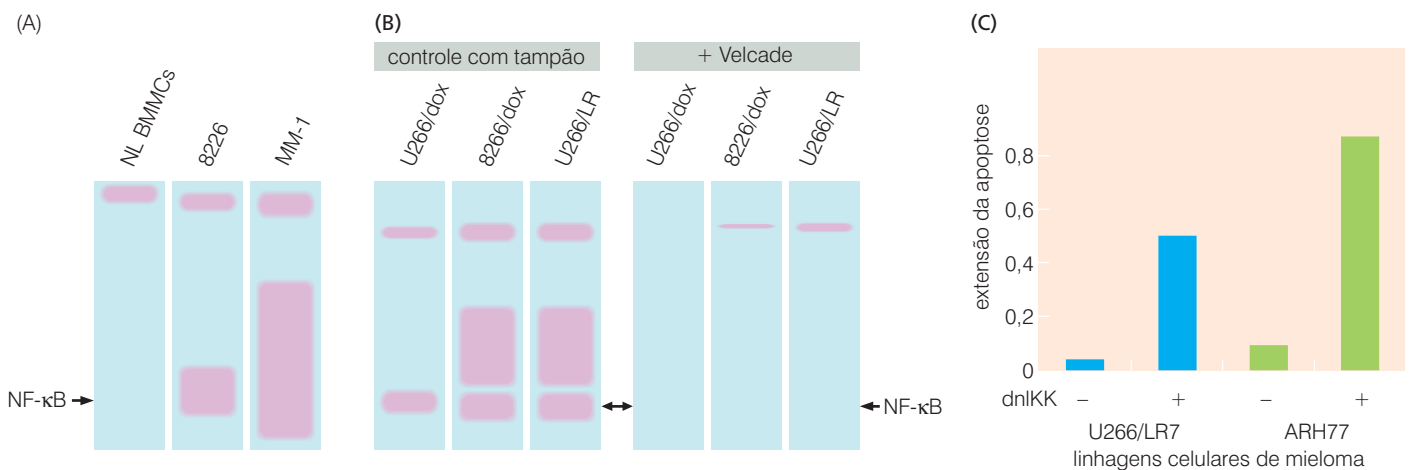


Figura 16.38 Evidências que suportam a importância da sinalização por NF- κ B na apoptose induzida por Velcade. O esquema apresentado na Figura 16.37 é suportado por várias linhas de evidências. (A) Em um ensaio de mudança de mobilidade eletroforética (EMSA; também chamado de ensaio de retardo em gel), a presença e a concentração de um fator de transcrição (TF) funcional de ligação ao DNA é acessada pela mistura de um extrato de proteínas nucleares com um oligonucleotídeo dsDNA marcado radioativamente que carrega um sítio de ligação para TF. A presença do TF de ligação ao DNA é refletida pela quantidade de oligonucleotídeo que formou um complexo nucleoproteína com o TF; a grande massa protéica associada ao oligonucleotídeo retarda a sua migração durante a eletroforese, fazendo com que ele migre para uma posição característica no gel. A seta indica a localização esperada de um complexo contendo o fator de transcrição NF- κ B e o oligonucleotídeo marcado radioativamente – nesse caso, um derivado do promotor do gene TNF- α , um alvo de ativação de NF- κ B. O ensaio indica pouca, quando detectada, atividade de NF- κ B em células mononucleares da medula óssea

normal (NL BMSCs), uma atividade considerável na linhagem celular (8226) do mieloma múltiplo (MM) e uma enorme quantidade de atividade de NF- κ B nas células da medula óssea preparadas diretamente a partir de um paciente de mieloma múltiplo (MM-1). (B) Um EMSA foi usado, como no painel A, para medir o nível do fator de transcrição NF- κ B funcional em três linhagens celulares MM tratadas com um tampão controle (três canaletas da esquerda) ou com Velcade (três canaletas da direita). Velcade é capaz de eliminar essencialmente toda a atividade NF- κ B nessas células. (C) A importância da sinalização progressiva de NF- κ B para a sobrevivência das células MM é demonstrada por este experimento, no qual um vetor expressando um IKK dominante negativo (dnIKK) foi introduzido em duas linhagens celulares de MM diferentes. Se a sinalização de NF- κ B fosse crítica para a ação do Velcade, então o dnIKK deveria mimetizar os efeitos do Velcade pela indução de apoptose nas células MM (veja a Figura 16.37) – resultado que é de fato observado aqui. Um vetor que não expressa dnIKK foi usado como controle. (A partir de M.H. Ma, H.H. Yang, K. Parker et al., *Clin. Cancer Res.* 9:1136-1144, 2003.)

Essas consequências da supressão da função dos proteassomas podem explicar muito bem grande parte do efeito potente do Velcade contra células de mieloma, algumas das quais, mas não todas, dependem da perturbação da sinalização de NF- κ B. Ainda, quando vistos com outros olhos, o racional de usar Velcade para inibir a função do proteassoma não faz sentido como estratégia terapêutica: uma vez que proteassomas são utilizados pelas células para degradar um arranjo diverso de proteínas celulares – provavelmente vários milhares de espécies de proteínas distintas –, a inibição de função dos proteassomas deveria ser altamente tóxica para todos os tipos de células do corpo. Portanto, agentes que funcionam como inibidores de proteassomas provavelmente não têm um índice terapêutico significativo, uma vez que eles são aptos para danificar células normais tanto quanto células cancerosas.

Apesar dessa lógica, baixas concentrações de Velcade exibem grande potência em matar células cancerosas *in vitro*, enquanto têm uma toxicidade mínima ou tolerável contra células de vários tipos de tecidos normais. Essa droga pode matar uma variedade de células cancerosas humanas cultivadas quando aplicada em concentrações que variam de dezenas a centenas de nanomolar. Ainda, a sua potência em matar células de mieloma – fazendo isso a concentrações tão baixas quanto 1 nM – é verdadeiramente incrível.

Antagonistas de NF- κ B provavelmente têm utilidade para tratar vários outros tipos de câncer. Lembre que NF- κ B tem um papel-chave no desenvolvimento de uma variedade de carcinomas (Seção 11.16) e pode ser necessário para a manutenção desses tumores uma vez que eles são formados. Além disso, o uso de arranjos de expressão de genes (Seção 16.1) revelou que linfomas grandes difusos de células B (DLBCLs), que sob o microscópio parecem constituir um único tipo homogêneo de tumor, podem, na verdade, ser classificados em três subgrupos distintos (veja a Figura 16.5). Células tumorais que pertencem ao subgrupo dos linfomas de células B ativadas e dos linfomas mediastinais têm um IKK ativado de forma constitutiva. Consequentemente, tumores que pertencem a esses dois subgrupos DLBCL, assim como uma variedade de outros tumores com sinalização NF- κ B hiperativa, têm se tornado alvos atrativos para o tratamento por Velcade ou por inúmeros inibidores de IKK que têm sido desenvolvidos por companhias farmacêuticas.

16.14 Um teratígeno para ovelhas pode ser útil como droga anticâncer altamente potente

Uma fonte potencial importante de terapêuticos anticâncer deriva de compostos que ocorrem naturalmente. O número de **produtos naturais** distintos produzidos por bactérias ou fungos está além de ponderação. Por exemplo, uma compilação de 1994 listou 11.900 compostos diferentes que foram isolados e exibiram atividade antibacteriana (i. e., antibiótica), alguns dos quais também possuíam atividade contra células de mamíferos. Outros três mil compostos mostraram outras atividades biológicas. Esses números estão apenas arranhando a superfície: uma estimativa, em 2001, do número de compostos distintos, biologicamente ativos, produzidos pelo gênero *Streptomyces* de bactérias chegou a centenas de milhares. Uma porção desses provavelmente possui forças citostáticas ou citotóxicas contra células de mamíferos incluindo células cancerosas. O universo de compostos derivados de plantas, biologicamente ativos, não está tão bem-explorado.

Em todos esses casos, as forças da evolução, em vez da inteligência de químicos orgânicos sintéticos, geraram espécies moleculares que são agentes farmacológicos potentes e altamente específicos. Várias dessas moléculas parecem ser usadas pelos organismos que as produzem para atacar competidores ou para se defender contra predadores. Uma vez que o número desses agentes que ocorrem naturalmente está elevado demais, é provável que eles sejam fontes de novos agentes anticâncer pelas décadas seguintes.

Um exemplo ilustrativo de um produto natural como esse veio da descoberta da ciclopamina, um produto natural de origem vegetal. Essa história em particular inicia com a observação de que ovelhas que pastam em áreas montanhosas do oeste dos Estados Unidos ocasio-

nalmente apresentavam epidemias de malformações congênitas em cordeiros, vários dos quais eram natimortos. A mais extrema dessas malformações foram aquelas envolvendo **ciclopia** – um único olho central. (O termo tem origem de Cyclops, o gigante mítico de um olho só, vencido por Ulysses junto com vários outros inimigos.)

Um trabalho de veterinário “detetive” iniciado na década de 1950 revelou que a ciclopia de cordeiros recém-nascidos era observada se ovelhas prenhas pastavam sobre falso heléboro, *Veratrum californicum* (Figura 16.39A), durante o 14º dia de gestação. Ainda outras malformações, incluindo fenda de palato e pernas mais curtas, eram evidentes se o pastejo ocorria em estágios mais iniciais ou mais tardios da gestação. Em 1968, o efeito **teratogênico** (indutor de malformação) do falso heléboro foi achado como sendo um alcalóide que foi chamado de ciclopamina (Figura 16.39B), que pode induzir ciclopia em uma ampla variedade de organismos (Figura 16.39C).

Várias dessas deformidades assemelham-se a uma condição em humanos chamada de holoprosencefalia, na qual o desenvolvimento de estruturas simétricas bilaterais na cabeça do embrião falha em proceder normalmente. Foi observado que alguns fetos humanos afligidos com essas condições carregavam mutações, herdadas na linhagem germinal, no gene para o receptor de *PTC* (*patched*) ou no gene *SHH* (*sonic hedgehog*), que codifica para o seu ligante. Vinte e três mutações em *SHH* distintas e três mutações em *PTC* foram associadas a essa condição. (De maneira mais geral, ciclopia está associada com cerca de 1 em 250 fetos humanos abortados espontaneamente.) Isso forneceu a primeira pista de que ciclopamina – um potente agente teratogênico – perturba a via de sinalização ativada por Hedgehog.

Nessa via de sinalização, um precursor do fator de transcrição Gli é normalmente clivado no citoplasma, permitindo que um produto da clivagem se mova para dentro do núcleo, onde ele atua como um repressor transcricional (Figura 16.40; veja também as Seções 5.7 e 6.12). A proteína Smoothed da membrana plasmática, que pode proteger a proteína precursora Gli da clivagem, é normalmente prevenida disso por causa da proteína receptora Patched (Ptc) pouco compreendida, também localizada na membrana plasmática. Entretanto, quan-

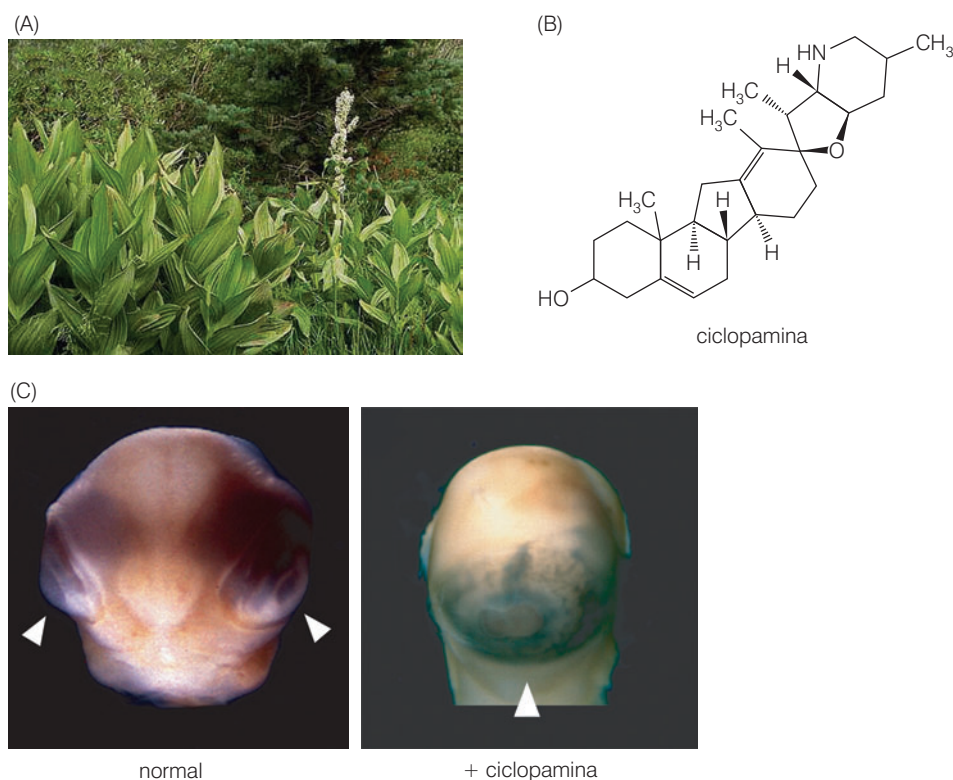


Figura 16.39 Falso heléboro e o seu produto teratogênico, ciclopamina (A) A planta *Veratrum californicum*, comumente chamada de falso heléboro, cresce nas campinas das montanhas do oeste americano. Ovelhas prenhas que pastam essas plantas frequentemente dão à luz a cordeiros natimortos com os principais defeitos morfogênicos na região da cabeça, indicando a presença de um potente teratogênico nessa planta. (B) O teratogênico foi identificado como ciclopamina e é produzido em uma série complexa de etapas biossintéticas dentro das células do falso heléboro. A sua estrutura se parece com a de um esteróide, como estrogênio ou progesterona. A complexidade dessa estrutura significa que a criação desse composto utilizando técnicas de química orgânica sintética é muito desafiadora, impedindo efetivamente a manufatura dessa droga em uma escala industrial. (C) O tratamento de um embrião de galinha com ciclopamina teve efeitos dramáticos na formação da cabeça, como também ocorreu em todos os embriões de vertebrados testados. Como visto aqui, os dois olhos normalmente presentes (*setas brancas, à esquerda*) são substituídos pelo rudimento de um único olho central (*ciclopia*) após a exposição a essa droga (*seta branca, à direita*). (A, a partir de Henriette Kress; C, cortesia de J.P. Incardona and Roelink.)

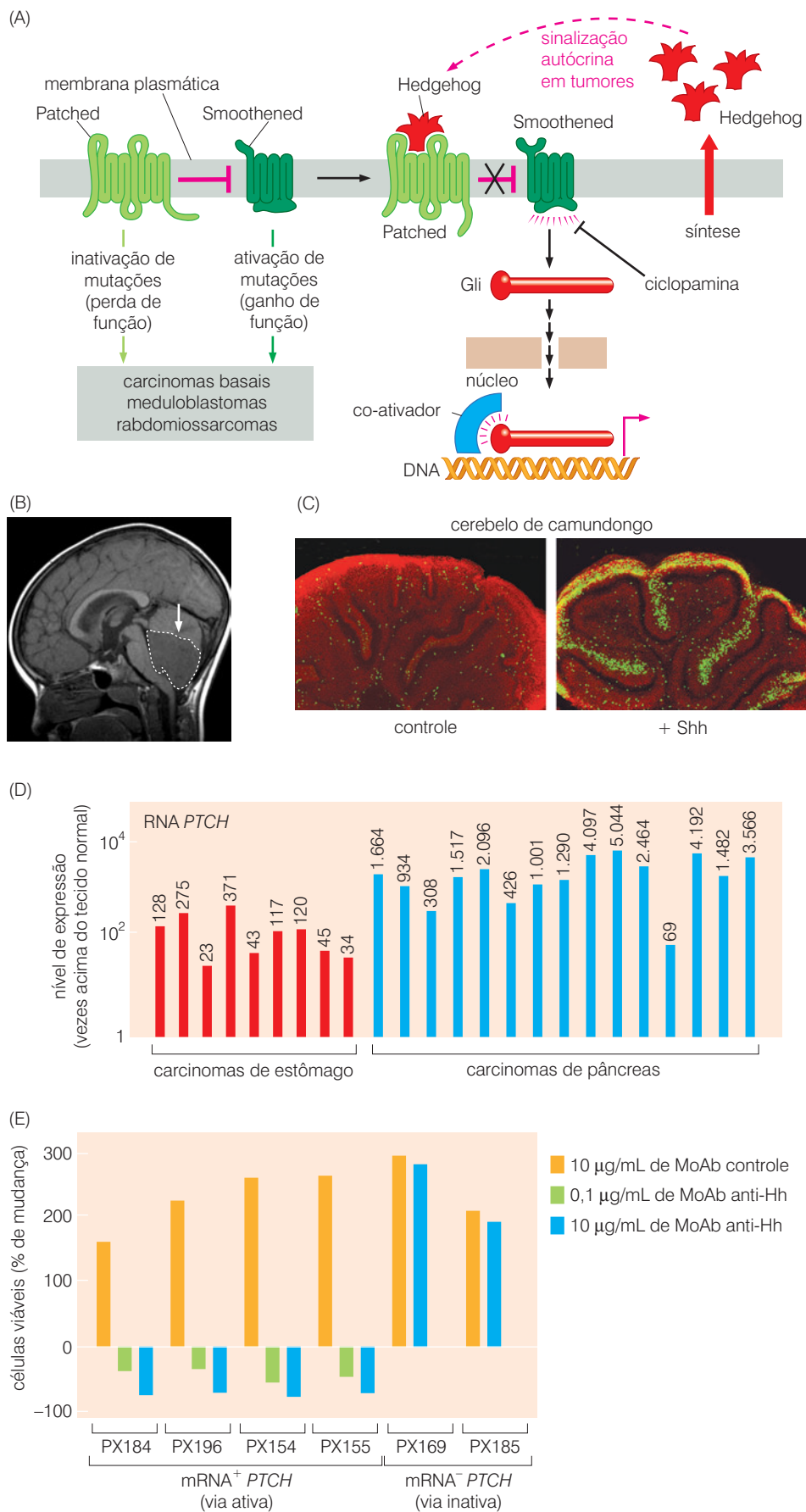


Figura 16.40 Perturbações da via de sinalização Patched-Smoothened (A)

Normalmente, Patched inibe a atividade de Smoothened (*no topo, à esquerda*). Entretanto, quando Patched se liga a Hedgehog (ou um ligante parente; *no topo, à direita*), ele não interage mais com Smoothened e, assim, permite que a última ative a sinalização Gli, o que resulta no movimento de Gli para dentro do núcleo, onde ela pode agir como um fator de transcrição promotor do crescimento. As consequências da ligação de Hedgehog podem ser mimetizadas por mutações que causam a perda da função de Patched ou ganham a função de Smoothened – alterações freqüentemente observadas nos carcinomas de células basais comuns da pele (*abaixo, à esquerda*). Vários carcinomas de origem endodermal liberam um ligante do tipo Hedgehog (*no topo, à direita*; p. ex., Indian Hedgehog, Sonic Hedgehog) que atua de uma maneira autócrina para direcionar a sua proliferação e sobrevivência. Além disso, vários meduloblastomas têm suas origens na desregulação dessa via de sinalização. Evidências recentes implicam a ciclopamina como um antagonista de Smoothened que previne a última de ativar Gli (veja a Figura 16.41). (B) Meduloblastomas surgem dos precursores de células granulares do cerebelo. Tal tumor, revelado aqui pelo rastreamento por tomografia computadorizada (CT) (*seta*), é o tumor de cérebro mais comum em crianças e freqüentemente tem resultados clínicos devastadores. (C) As células granulares do cerebelo normal respondem fortemente às ações mitogênicas de um ligante Hedgehog adicionado – nesse caso, o Sonic Hedgehog (Shh). Como visto nestas fatias de cerebelo de um camundongo jovem, a atividade proliferativa das células granulosas na superfície das dobras do cerebelo, que na fatia controle (*esquerda*) é mínima nesse estágio do desenvolvimento, é fortemente estimulada pela adição de Shh (*direita*). Nesse caso, a atividade proliferativa (*verde*) é medida pela incorporação de bromodeoxiuridina (BrdU), um análogo da deoxitimidina, ao DNA. (D) O nível de Patched fornece uma medida direta da atividade da via de Hedgehog (uma vez que Gli induz a transcrição do gene *PTCH*). Aqui, os níveis de mRNA de *PTCH* foram medidos por PCR em tempo real (RT-PCR) em uma série de carcinomas humanos de estômago e pâncreas removidos cirurgicamente, e, em cada caso, o nível de expressão de mRNA de *PTCH* foi comparado com aquele do tecido normal correspondente. A medida da superexpressão (*número acima de cada barra*) indica uma ativação evidente da sinalização por Gli (e, assim, da via Hedgehog) nesses tumores. (E) A importância de uma alça de sinalização autócrina é indicada pelas respostas de seis passagens iniciais em culturas de células de carcinoma de pâncreas, quatro das quais mostraram sinalização Gli ativa (sendo positivas para mRNA de *PTCH*, *esquerda*) e duas das quais não mostraram (*direita*). Quando adicionado a culturas dessas células, 5E1, um anticorpo monoclonal que neutraliza tanto a proteína Indian como a Sonic Hedgehog, exerceu um forte efeito na supressão do crescimento e na viabilidade das células do carcinoma nas quais a sinalização Gli foi alta, mas não teve efeito nas células do carcinoma que não tinham atividade Gli. Isso indicou a importância de uma alça de sinalização autócrina extracelular, envolvendo proteínas Hedgehog, no direcionamento do crescimento dessas células. (B, cortesia de St. Jude Children's Research Hospital; C, a partir de R.J. Wechsler-Reya and M.P. Scott, *Neuron* 22:103-114, 1999; D e E, a partir de D.M. Berman, S.S. Karhadkar, A. Maitra et al., *Nature* 425:846-851, 2003.)

do o ligante de Hedgehog (Hh) se liga a Patched, este último não inibe mais Smoothened (Smo); Smoothened agora corre para proteger Gli da clivagem que em geral ocorre, e Gli intacta pode se mover para dentro do núcleo, no qual ela atua como um fator de transcrição do tipo dedo de zinco para induzir a expressão gênica. Essa via de sinalização está envolvida em uma ampla variedade de etapas morfogênicas tanto em embriões de *Drosophila* como em vertebrados.

Mutações na linhagem germinal do gene que codifica para Patched têm sido detectadas na condição de pele chamada de síndrome do nevo da célula basal. A perda de heterozigose (LOH) no loco PTC nas células da pele permite que esses nevus se desenvolvam em carcinomas de células basais (BCCs; veja a Seção 6.12). Além disso, pelo menos 40% dos carcinomas de células basais esporádicos – tumores de pele extremamente comuns causados por radiação UV – carregam mutações do gene *PTCH* inativadoras ou mutações do gene *SMO* ativadoras. (Projeções futuras da incidência da doença indicam que 28% dos brancos nasci-

dos nos Estados Unidos depois de 1994 desenvolverão no mínimo um BCC durante a sua vida.) Felizmente, esses tumores de pele são relativamente inofensivos e facilmente tratados. Mas outros tipos de tumores associados a alelos mutantes desses dois genes, notavelmente tumores de células musculares e cerebelares (i. e., meduloblastomas; Figura 16.40B), não são.

Uma importante extensão desses achados originou-se a partir da descoberta de um outro tipo de desregulação dessa via. Foi observado que um grupo diverso de células humanas cancerosas cultivadas expressava altos níveis não-comuns de um dos dois principais ligantes do receptor Smoothened, especificamente Indian Hedgehog ou Sonic Hedgehog. Essas células derivaram de carcinomas que surgiram do epitélio que delimita o esôfago, o estômago, o ducto biliar, o pulmão e o cólon. (De maneira intrigante, esses diversos tumores derivaram de órgãos que surgiram a partir da endoderme embrionária.) Mais tarde, carcinomas de próstata, que não são de origem endodermal, foram adicionadas a essa lista. No caso dos carcinomas pancreáticos, foi observada a superexpressão de um ligante Hedgehog em mais de 70% das amostras de tumor testadas. (Em epitélios normais, o ligante Hedgehog e a via de sinalização *downstream* que é ativada são responsáveis pela manutenção das células-tronco que se auto-renovam.)

Presume-se que a secreção de altos níveis do ligante Hedgehog por essas várias células tumorais ative uma alça de sinalização autócrina que resulta na ativação constitutiva da sinalização e, assim, na emissão contínua de Gli intacta, ativadora da transcrição, para o núcleo das células cancerosas (veja a Figura 16.40D). O papel-chave de Hedgehog no direcionamento da proliferação de alguns desses tipos de células tumorais foi confirmado pela adição de anticorpos neutralizantes Hedgehog ao seu meio de cultura, que parou a sua proliferação (veja a Figura 16.40E). Ao contrário, foi observado que Hedgehog adicionado ao seu meio de cultura era potentemente mitogênico (Figura 16.40C). Como pode ser esperado, esses efeitos citostáticos e até mesmo citotóxicos do anticorpo anti-Hedgehog foram apenas vistos em células tumorais que também mostraram expressão da proteína receptora de Smoothened.

Em 2000, observou-se que a ciclopamina inibia diretamente a proteína Smoothened (Figura 16.41). Além disso, essa interação bloqueou a sinalização anormal resultante da síntese excessiva de Hedgehog ou de mutações no gene *SMO*. Isso sugeriu que os efeitos teratogênicos da ciclopamina derivam diretamente da sua habilidade em bloquear a sinalização por Hedgehog em junções críticas no desenvolvimento embrionário. Além disso, essa ausência de sinalização adequada por Hedgehog durante o desenvolvimento contrasta com a atividade excessiva dessa via em uma variedade de malignidades.

A descoberta da associação entre ciclopamina e Smoothened levou, por sua vez, ao tratamento de uma variedade de linhagens celulares tumorais humanas positivas para Hedgehog com ciclopamina, o que resultou em uma inibição de 75 a 95% da proliferação celular. Por exemplo, células de meduloblastoma humano cultivadas, nas quais foi observado que a via de sinalização Hedgehog era hiperativada, responderam a ciclopamina pela parada do crescimento e pela rápida perda da viabilidade, enquanto células de outros tipos de tumores de cérebro (glioblastomas e ependimomas) não foram afetadas pelo tratamento com ciclopamina. Esse tratamento não teve efeito sobre outras linhagens celulares tumorais nas quais a via de sinalização Hedgehog não foi ativada, demonstrando que a ciclopamina não era um simples agente citotóxico não-específico de atuação ampla. Além disso, o tratamento de camundongos, nos quais um carcinoma de vesícula biliar (um outro tumor endodermal secretor de Hedgehog) foi implantado, mostrou um bloqueio total da habilidade formadora de tumor (Figura 16.42A).

A presença de altos níveis de Hedgehog em cerca de 70% dos carcinomas pancreáticos humanos sugere que a ativação da via Hh-Smo-Ptc-Gli é parte integral dos programas de crescimento neoplásico desses tumores, enquanto essa via de sinalização parece ter um pequeno papel, se algum, em vários outros tipos de cânceres e na manutenção de vários tecidos normais. Além disso, a exposição por longo tempo de camundongos adultos a níveis terapêuticos de ciclopamina não gerou até agora qualquer indicação de toxicidade. Tudo isso deveria

augurar bem para a candidatura da ciclopamina como um agente altamente útil para o tratamento de subgrupos de cânceres humanos que exibem vias de sinalização Hedgehog hiperativadas.

Na verdade, a candidatura da ciclopamina como um agente terapêutico anticâncer útil tem três pontos contra ela. Como outros produtos naturais, a ciclopamina é o resultado final de uma série complexa de reações enzimáticas que são difíceis de reproduzir no laboratório de síntese orgânica química. Segundo, a obtenção de quantidades significativas de *V. californicum* não é prática. Finalmente, apesar dos resultados mencionados anteriormente com camundongos, a ciclopamina é considerada muito tóxica para ser usada em humanos.

Assim, têm sido desenvolvidos antagonistas alternativos de Smoothened que provavelmente serão tão potentes quanto a ciclopamina na interrupção da via Hedgehog, mas não têm a toxicidade da ciclopamina. Smoothened é um receptor da superfície celular que atravessa a membrana sete vezes e, portanto, tem uma estrutura geral que se assemelha muito com aquela de vários receptores acoplados à proteína G (GPCRs; Seção 5.7) produzidos por células de mamíferos. O desenvolvimento de compostos de baixo peso molecular altamente específicos que têm como alvo GPCRs parece ser, em vários casos, relativamente fácil. Como consequência, várias companhias farmacêuticas têm desenvolvido drogas com alta especificidade que têm como alvo Smoothened e mostram mínimos efeitos sobre outros receptores celulares.

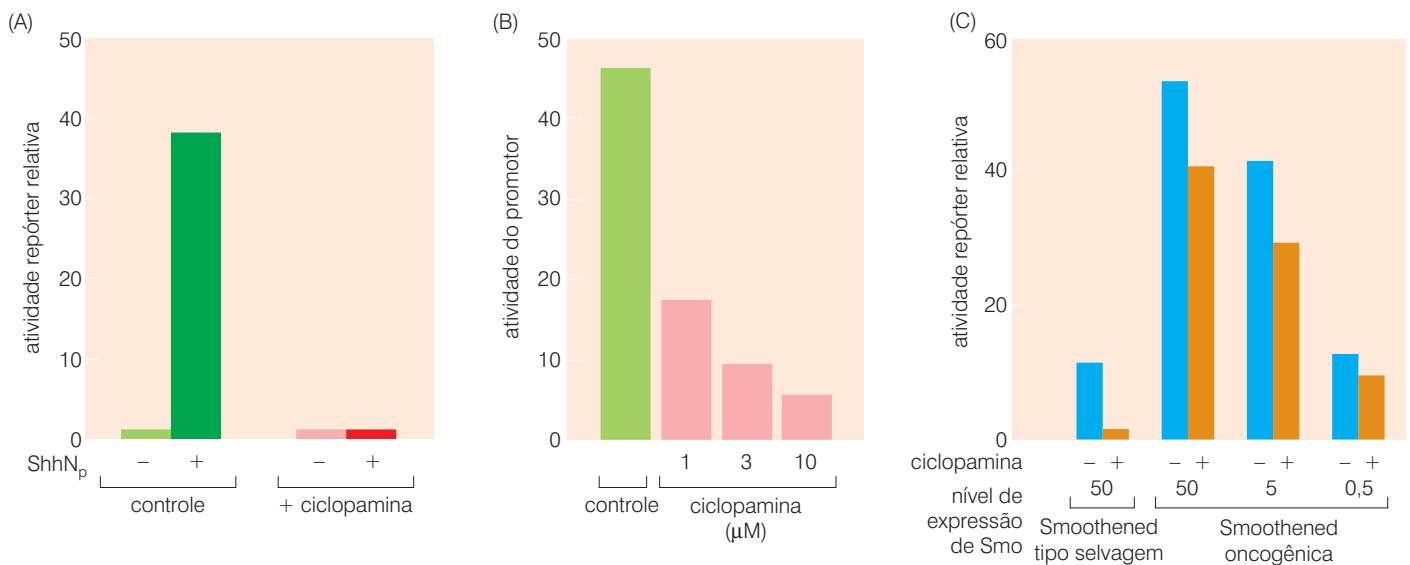


Figura 16.41 Ações da ciclopamina sobre a via Patched-Smoothened (A) No experimento mostrado aqui, a atividade de Smoothened foi medida indiretamente pela medição da atividade de um gene repórter cuja transcrição é direcionada por Gli em células NIH 3T3 de camundongo. Na ausência de adição do ligante Sonic hedgehog (ShhNp), uma variante Hedgehog que também é um ligante do receptor Patched, não houve atividade de Gli (barra verde-clara). Na presença de ShhNp, a atividade de Gli foi fortemente estimulada (barra verde-escura), e essa indução foi revertida pelo tratamento com ciclopamina (barras cor-de-rosa e vermelhas). Isso demonstrou que a ciclopamina age contra os efeitos do ligante Hedgehog e, por isso, provavelmente está *downstream* do receptor Patched na via de sinalização. (B) O alvo de ação da ciclopamina foi localizado mais tarde por esse experimento, no qual a atividade de Gli (medida como no painel A) foi medida em células *PTCH^{-/-}*. A atividade Gli, como antes, foi suprimida por ciclopamina, confirmando que essa droga provavelmente interfere em um passo

downstream e independente de Patched. (C) Quando Smoothened tipo selvagem (Smo) foi expressa em altos níveis em células NIH 3T3, a sua atividade foi, novamente, suprimida pela adição de ciclopamina, como indicado pela atividade do gene repórter regulado por Gli (barras azuis e cor-de-laranja, esquerda). Entretanto, quando um mutante, atuando de forma dominante, Smoothened oncogênico foi expresso nos mesmos níveis ou mais baixos (barras à direita), a sinalização foi totalmente resistente à inibição por ciclopamina. Isso indicou que Smoothened estava *downstream* ou era alvo direto da ação da ciclopamina. Estudos subsequentes geraram uma série de mutantes, proteínas Smoothened ativas de forma constitutiva que eram todas resistentes à inibição por ciclopamina, reforçando a noção de que a ciclopamina interage diretamente com Smoothened (veja a Figura 16.40A). Análises bioquímicas então demonstraram a ligação direta da molécula de ciclopamina a Smoothened (não-mostrado). (A partir de J. Taipale, J.K. Chen, M.K. Cooper et al., *Nature* 406:1005-1009, 2000.)

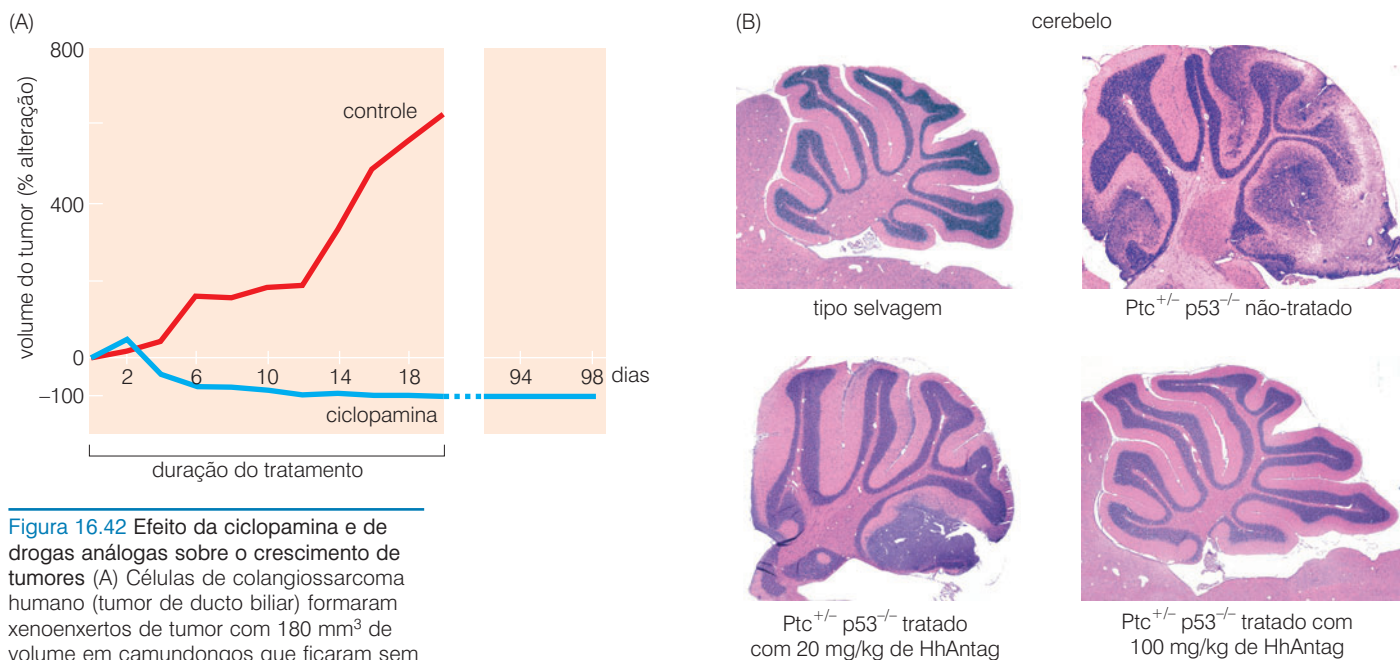


Figura 16.42 Efeito da ciclopamina e de drogas análogas sobre o crescimento de tumores (A) Células de colangiossarcoma humano (tumor de ducto biliar) formaram xenoenxertos de tumor com 180 mm³ de volume em camundongos que ficaram sem tratamento (linha vermelha) ou foram tratados durante 22 dias com ciclopamina (linha azul). No último caso, o tumor encolheu e não reapareceu nos 76 dias que seguiram na ausência de mais tratamento com ciclopamina. (B) Camundongos com genótipo $Ptc^{+/-} p53^{-/-}$ desenvolveram meduloblastomas por todo o seu cerebelo cedo na vida. Com cinco semanas de vida, o cerebelo de um camundongo tipo selvagem (no topo, à esquerda) é muito menor do que no mutante com tendência a tumor (no topo, à direita). Um antagonista Smoothened, chamado HhAntag, foi identificado na triagem de uma biblioteca de drogas. Quando o camundongo mutante foi tratado com a droga duas vezes por dia entre a terceira e a quinta semanas de vida, com 20 mg ou 100 mg por kg de peso corpóreo, os tumores regrediram parcial ou completamente (abaixo, à esquerda e à direita). Tratamentos subsequentes de camundongos mutantes com 8 e 10 semanas de idade, com tumores muito maiores, geraram respostas terapêuticas comparáveis (não-mostrado). (A partir de D.M. Berman, S.S. Karhadkar, A. Maitra et al., *Nature* 425:846-851, 2003; B, a partir de J.T. Romer, H. Kimura, S. Magdaleno et al., *Cancer Cell* 6:229-240, 2004.)

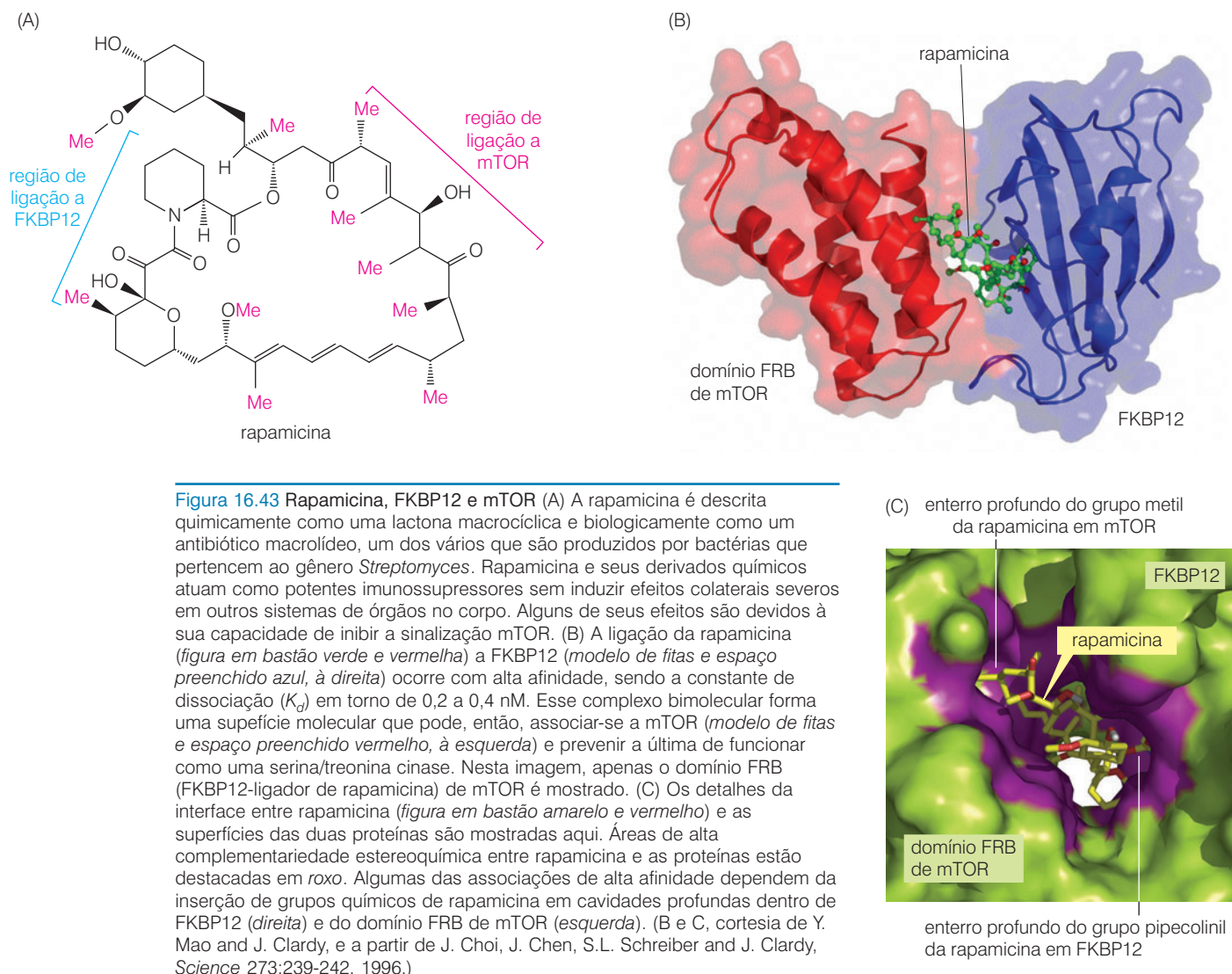
Com o objetivo de testar esses novos compostos, foi criado um modelo murino de meduloblastoma humano que depende da inativação (veja a Barra lateral 7.10) de uma cópia do gene *Ptc* e ambas as cópias do gene *p53* na linhagem germinal de camundongo, gerando um genótipo $Ptc^{+/-} p53^{-/-}$; virtualmente todos esses camundongos desenvolvem meduloblastomas com três meses de idade. Um inibidor de Smoothened, chamado de HhAntag, que tem 10 vezes a potência da ciclopamina, foi sintetizado e é capaz de passar facilmente pela barreira hematoencefálica, a barreira biológica especializada que protege o tecido do cérebro do conteúdo da circulação. Como visto na Figura 16.42B, o tratamento de camundongos mutantes de três semanas de idade que desenvolveram meduloblastomas com HhAntag causou a regressão do tumor dentro de duas semanas; isso ocorreu com pouca, se alguma, toxicidade sistêmica.

No caso do câncer de pâncreas, a perspectiva de desenvolver um inibidor da via de sinalização Hedgehog útil clinicamente é excitante. No momento, esse carcinoma, no qual a sinalização Hedgehog com frequência tem um papel proeminente, tem um resultado fatal quase que inevitável: uma vez que esse câncer foi diagnosticado em um paciente, a probabilidade de sobreviver por outros cinco anos é menor do que 4%. Isso contrasta com os cinco anos de sobrevivência, em 1998, de pacientes americanos diagnosticados com câncer de mama (86%) e câncer de próstata (97%).

Meduloblastomas, em grande parte tumores pediátricos, ocorrem cerca de um décimo das vezes dos carcinomas pancreáticos; no momento, quase dois terços dos pacientes são curados desse tumor por uma combinação de cirurgia, radiação e quimioterapia; esse tratamento pode, entretanto, deixar os sobreviventes com debilitações neurológicas significativas, incluindo o comprometimento das funções cognitivas. Entretanto, ironicamente, o maior incentivo econômico para desenvolver mimetizadores da ciclopamina provavelmente deriva da necessidade de tratar o mais benigno, mas também o tipo de câncer humano mais comum – o carcinoma de células basais da pele.

16.15 mTOR, o principal regulador da fisiologia celular, representa um alvo atrativo para a terapia anticâncer

A história final é a mais curta de todas, mesmo que ela apenas descreva um circuito regulador que ainda não está completamente compreendido e gerou pouco sucesso clínico até agora.



Apesar de tudo, esse circuito tem todos os atributos para gerar terapias que irão competir ou até mesmo obscurecer alguns dos que foram descritos antes neste capítulo.

Essa história também inicia com um produto natural – a rapamicina – que foi isolado na década de 1960, a partir da bactéria *Streptomyces hygroscopicus*, que cresce no solo de Rapa Nui, conhecida como Ilha da Páscoa, no meio do Pacífico. No início dos anos 1970, ela foi novamente isolada por uma companhia, que a desenvolveu como um agente antifúngico. Nas décadas seguintes, tornou-se claro que rapamicina (Figura 16.43A) pode agir para parar o crescimento de um espectro extraordinariamente amplo de células eucarióticas, variando daquelas de leveduras até as de mamíferos.

Foi observado que a rapamicina tinha forças imunossupressoras, mesmo quando usada em baixas concentrações. Em 1999, foi aprovada pelo U.S. Food and Drug Administration (FDA) para prevenir a imuno-rejeição de órgãos transplantados, principalmente rins. Essa droga, também chamada de sirolimus, funciona sinergisticamente com outros imunossuppressores, especificamente ciclosporina e esteróides, para assegurar um enxerto de longo prazo sem causar maiores efeitos colaterais no receptor do transplante. As razões para suas ações seletivas de afetar com preferência o sistema imune não são completamente compreendidas. (De maneira intrigante, a imunossupressão por ciclosporina nos receptores de órgãos transplanta-

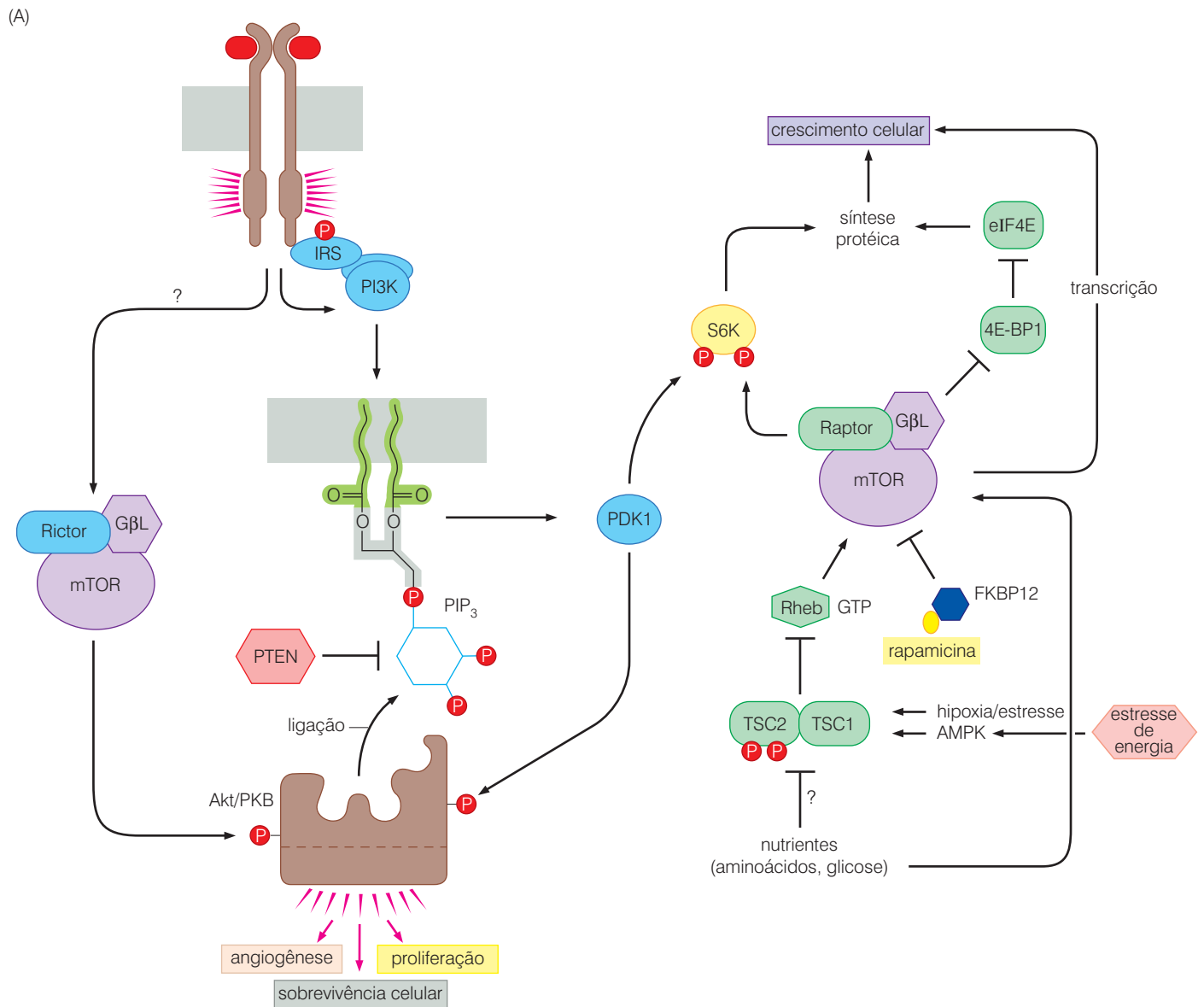
dos leva a um risco elevado de malignidades (veja a Seção 15.9), enquanto a imunossupressão induzida por rapamicina nesses pacientes na verdade reduz o risco de distúrbios linfoproliferativos após o transplante. Portanto, a noção de que a imunossupressão sempre leva a um aumento no risco de câncer deve ser refinada, uma vez que alguns tipos de imunossupressão geram uma incidência de tumor aumentada, enquanto outros tipos não o fazem.)

Análises bioquímicas mostram que a rapamicina se liga diretamente a uma proteína de baixo peso molecular, chamada de FKBP12 (proteína ligadora de FK506 com 12 kD), originalmente descoberta porque também é ligada por FK506, uma droga que atua de forma similar. Uma vez formado, o complexo rapamicina-FKBP12 (Figura 16.43B) se associa a uma proteína, que foi identificada em 1994, chamada de mTOR (alvo da rapamicina em mamíferos), e a desliga. mTOR é uma proteína grande (289 kD) que funciona como uma serina/treonina cinase; o seu domínio de cinase lembra aquele da cinase PI3 e de enzimas relacionadas.

mTOR é de especial interesse, porque funciona como uma ligação crítica no circuito controle de células de mamíferos (Figura 16.44A). Assim, mTOR integra uma variedade de sinais aferentes (i. e., que entram), incluindo a disponibilidade de nutrientes e mitógenos e, tendo feito isso, atua para controlar a importação de glicose e a síntese protéica. Mais especificamente, mTOR fosforila dois governadores-chave da tradução: cinase p70S6 (S6K1) e 4E-BP1. Essa fosforilação ativa S6K1, que então procede a fosforilar a proteína S6 da subunidade ribossomal pequena (40-S), permitindo que essa subunidade participe da formação do ribossomo (pela associação com a subunidade ribossomal maior) e, assim, da síntese protéica.

Figura 16.44 O circuito de mTOR e as respostas tumorais a mTOR (A) mTOR está no meio de um circuito complexo regulador que integra sinais de entrada sobre a disponibilidade de nutrientes, tensão de oxigênio, níveis de ATP e sinais mitogênicos e, como resposta, libera sinais que governam a biogênese do ribossomo, a síntese de proteínas, a proliferação celular, a proteção contra apoptose, a angiogênese e, até mesmo, a motilidade celular. mTOR existe em dois complexos alternativos com seus parceiros Rictor (à esquerda) e Raptor (à direita); os dois complexos se intercomunicam de forma ainda obscura. O complexo mTOR-Rictor governa a atividade de Akt/PKB pela adição de um segundo fosfato crítico para Akt/PKB e, assim, ganha controle sobre os efetores múltiplos de Akt/PKB *downstream*. A exposição à rapamicina (à direita, abaixo) inibe rapidamente o complexo mTOR-Raptor e, após extensos períodos, causa um desligamento progressivo do complexo mTOR-Rictor. (B) Camundongos BALB/c carregando células injetadas de uma linhagem celular de adenocarcinoma de cólon singênico desenvolveram tumores grandes bem-vascularizados (à esquerda) 35 dias após a injeção. Entretanto, quando o crescimento desses tumores é permitido por uma semana após a qual os camundongos recebem tratamento contínuo com doses de rapamicina comparáveis àsquelas usadas em humanos para imunossupressão, os tumores são muito menores (à direita), e a densidade de microvasos nesses tumores é menos do que a metade daquela observada nos tumores controle (não-mostrado). (C) Osteossarcomas geralmente respondem pouco a vários tipos de quimioterapia. Entretanto, no caso de um paciente de 23 anos de idade com osteossarcoma, o tratamento com AP23573, um análogo da rapamicina, gerou um decréscimo de mais de 50% no valor-padrão máximo de captação (SUV_{max}) de glicose marcada radiativamente por uma metástase dentro de cinco dias de tratamento e mais de 85% de diminuição em 54 dias de tratamento (setas brancas). Enquanto tais respostas não são típicas, elas indicam o potencial desse tipo de tratamento e a possibilidade de que, no futuro, condições serão encontradas para permitir respostas similares em uma proporção significativa de tais pacientes. Cada uma dessas imagens é uma fusão de duas imagens obtidas inicialmente por CT (tomografia de raios X computadorizada) e PET (tomografia de emissão de pósitrons); a última mede a extensão da captura da glicose marcada radiativamente, que geralmente é elevada em tecidos neoplásicos. (A, a partir de D.A. Guertin and D.M. Sabatini, *Trends Mol. Med.* 11:353-361, 2005; B, a partir de M. Guba, von Breitenbuch, M. Steinbauer et al., *Nat. Med.* 8:128-135, 2002; C, cortesia de S. P. Chawla and K.K. Sankhala, Century City Doctors' Hospital and John Wayne Cancer Institute, e de C. L. Bedrosian, Ariad Pharmaceuticals, Inc.)

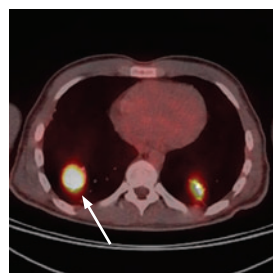
Além disso, fosforilando 4E-BP1, mTOR faz com que 4E-BP1 libere a sua ligação com o fator de iniciação da tradução eIF4E (fator eucariótico de iniciação 4E); uma vez liberado, eIF4E forma complexos com vários outros fatores de iniciação, e os complexos resultantes permitem que os ribossomos iniciem a tradução de certos mRNAs, especificamente aqueles



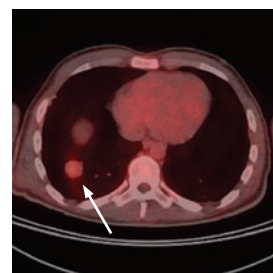
(B) controle + rapamicina



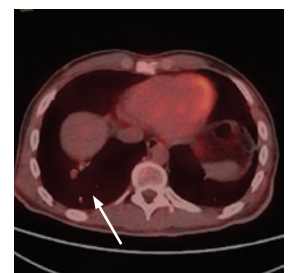
(C)



início do tratamento com AP23573



5 dias de tratamento



54 dias de tratamento

com regiões de oligopirimidina na sua região 5' não-traduzida. Juntas, essas várias ações permitem que mTOR seja um governador-chave do crescimento celular (em vez de proliferação celular; veja a Figura 8.2).

Até recentemente, acreditava-se que mTOR fosse um dos substratos *downstream* de Akt/PKB, especificamente aquele que permite que Akt/PKB regule o crescimento celular pelo controle da síntese protéica. Mas isso está mudando: entende-se agora que mTOR é ativador-chave *upstream* de Akt/PKB. Essa mudança coloca mTOR em uma posição muito mais potente na célula. Pelo controle de Akt/PKB, mTOR pode regular a apoptose e a proliferação, além da sua habilidade conhecida de regular o crescimento celular.

Na verdade, mTOR aparece em dois locais do circuito descrito na Figura 16.44A, uma vez que ele é capaz de se associar a dois parceiros alternativos, chamados Raptor e Rictor. O complexo mTOR-Rictor (juntamente com uma terceira proteína, GβL) é regulado de maneiras desconhecidas por fatores de crescimento e é responsável pela ativação de Akt/PKB. O complexo mTOR-Raptor (+GβL), sobre o qual se conhece mais, é responsável pela ativação da síntese protéica (pela fosforilação de S6K1 e 4E-BP1). Atuando junto com FKBP12, a rapamicina interage diretamente com o complexo mTOR-Raptor, que é rapidamente inibido depois que essa droga é aplicada às células. Entretanto, se o tratamento com rapamicina é continuado por várias horas, finalmente o complexo mTOR-Rictor também é desligado, resultando na inibição de Akt/PKB. O mecanismo pelo qual a rapamicina tem sucesso em inibir o complexo mTOR-Rictor é pouco compreendido.

Esse efeito inibitório sobre a sinalização de Akt/PKB parece ser responsável por grande parte do efeito da rapamicina sobre células do câncer que exibem um PI3K hiperativado ou perda da expressão de PTEN. É plausível que tais células, de maneira muito semelhante às células de carcinoma pulmonar de células pequenas com receptores EGF mutantes (Barra lateral 16.3), tenham se tornado “viciadas” nos sinais de Akt/PKB e dêem uma guinada para apoptose no momento em que elas forem privadas desses sinais pelas ações da rapamicina e de drogas relacionadas. Entretanto, as regras precisas que determinam a sensibilidade ao tratamento com rapamicina ainda devem ser trabalhadas.

O circuito regulador mostrado na Figura 16.44A intersecta em vias adicionais com a patogênese do câncer. Por exemplo, TSC1 e TSC2 (também chamadas de hamartin e tuberlin) já apareceram neste livro no contexto de seus papéis como proteínas supressoras de tumores. A perda de qualquer uma dessas proteínas leva a esclerose tuberosa (Tabela 7.1); e, como visto na Figura 8.2, a perda de TSC1 resulta na formação de células gigantes tanto em moscas como em humanos. TSC2 atua como uma GAP (proteína ativadora de GTPase; veja, por exemplo, a Barra lateral 5.11) para Rheb, uma pequena proteína semelhante a Ras. Enquanto TSC2 permanecer no estado ligado a GTP, Rheb contribui de maneiras desconhecidas para estimular o complexo mTOR-Raptor-GβL; entretanto, uma vez que TSC2 induziu Rheb para hidrolizar o seu GTP, Rheb perde sua atividade estimuladora. No momento, outras conexões sinalizadoras entre o circuito mTOR e a crítica indução de crescimento e proteínas mitogênicas estão progredindo pela pesquisa em andamento.

Vários derivados da rapamicina têm sido produzidos, e três estão em testes clínicos de fase inicial. O seu desenvolvimento tem sido encorajado, em parte, pela observação de que drogas, como a rapamicina, podem ser toleradas por períodos extensos por receptores de transplantes, indicando um nível baixo tolerável de efeito tóxico colateral. Nos experimentos pré-clínicos, a rapamicina dada aos camundongos em níveis que são usados para imunossupressão crônica tem fortes efeitos na supressão de neoangiogênese associada a tumor e, portanto, o crescimento tumoral (Figura 16.44B), um efeito que pode ser explicado pelo fato de que uma das três isozimas Akt/PKB, Akt1, é crítica para a habilidade das células endoteliais e seus precursores para responder a estimulação por fatores de crescimento do edotélio vascular (VEGF).

Em alguns testes clínicos, notavelmente aqueles com enfoque no tratamento de sarcomas, ocasionalmente têm sido observadas respostas clínicas que são bastante marcantes (Figura 16.44C). E, em 2006, foi reportado que a rapamicina induz regressão de astrocitomas asso-

ciados a esclerose tuberosa (veja a Figura 8.2B). Na verdade, são respostas clínicas como essas que têm motivado a discussão sobre o circuito mTOR neste capítulo. Elas fornecem dicas atormentadoras de como esse circuito pode ser um dia manipulado para induzir a morte de células cancerosas, gerando melhoras substanciais na terapia dos tumores sólidos. Esses avanços provavelmente aparecerão à medida que os oncologistas aprenderem quais tipos de células cancerosas são particularmente sensíveis aos análogos de rapamicina, muitas vezes na presença de outras drogas terapêuticas colaboradoras.

16.16 Sinopse e perspectivas: desafios e oportunidades no caminho adiante

“Quando o câncer será curado?” Essa é a questão simples e lógica mais freqüentemente colocada aos pesquisadores de câncer por aqueles que não estão diretamente envolvidos nessa área de pesquisa bioquímica. Nas suas mentes, estão as histórias de outras medidas de saúde pública. Doenças infecciosas, como pólio e varíola, podem ser prevenidas, e as infecções bacterianas são quase invariavelmente curadas. Doenças do coração estão aos olhos de muitos, bem no caminho de serem prevenidas. Por que com o câncer deveria ser diferente?

A informação neste livro fornece algum discernimento para as respostas a essas questões. Tanto quanto temos invocado a unificação dos conceitos para retratar o câncer como uma doença única, a realidade – ao menos aos olhos de oncologistas clínicos – é muito diferente. O câncer é, na verdade, uma coleção de mais de 100 doenças, cada uma afetando uma célula distinta ou um tipo de tecido no corpo.

Análises patológicas nos levaram a utilizar esse número, ou outro um pouco maior. (Por exemplo, existem no mínimo oito categorias histopatológicas diferentes de câncer de mama.) Entretanto, mesmo o número expandido, grande como possa ser, representa uma ilusão: o uso corrente de diagnóstico molecular, especificamente arranjos de expressão gênica, está levando a uma explosão de subcategorias, de modo que, na segunda década do novo milênio, várias centenas de doenças neoplásicas distintas provavelmente serão reconhecidas, cada uma seguindo o seu próprio curso clínico razoavelmente predizível e exibindo a sua própria responsividade para formas específicas de terapia. Com a passagem do tempo, o diagnóstico do câncer será feito cada vez mais usando bioinformática em vez dos olhos treinados de um patologista.

Assim, a resposta inicial para questões sobre “a cura” é que não existirá um atalho principal único que curará todos os cânceres – uma vitória decisiva no campo de batalha –, simplesmente porque o câncer não é uma doença única. Em vez disso, existirão vários conflitos pequenos que irão reduzir constantemente os índices gerais de morte de vários tipos de câncer. E, como certos defeitos moleculares e processos patológicos (p. ex., angiogênese) são compartilhados por múltiplos cânceres humanos, existirão ocasiões em que avanços terapêuticos sobre várias frentes serão realizados concomitantemente.

Antes de especularmos sobre o futuro da terapia do câncer, é válido dar um passo para trás e acessar o escopo do desafio: (1) quão grande é o problema do câncer e, no futuro, o quão desesperadora será a necessidade de curar vários tipos de doenças neoplásicas? (2) O quão bem estamos fazendo agora para curar os principais tumores sólidos?

A epidemiologia e a demografia fornecem algumas respostas para a primeira questão. Elas geram estimativas moderadas do caminho à frente. As estatísticas na Figura 16.45 demonstram que o câncer é, em grande parte, uma doença dos mais velhos, cujo número está crescendo mais rapidamente e continuará assim, gerando aumentos progressivos nos números de mortes relacionadas ao câncer (mortalidade) por todas as décadas a seguir.

Igualmente importante, ainda temos apenas maneiras muito imperfeitas de medir a incidência – com qual freqüência a doença dá o golpe. Isso complica muito as estimativas de efetividade das terapias atuais e as necessidades futuras para terapias. Como indicado na Figura

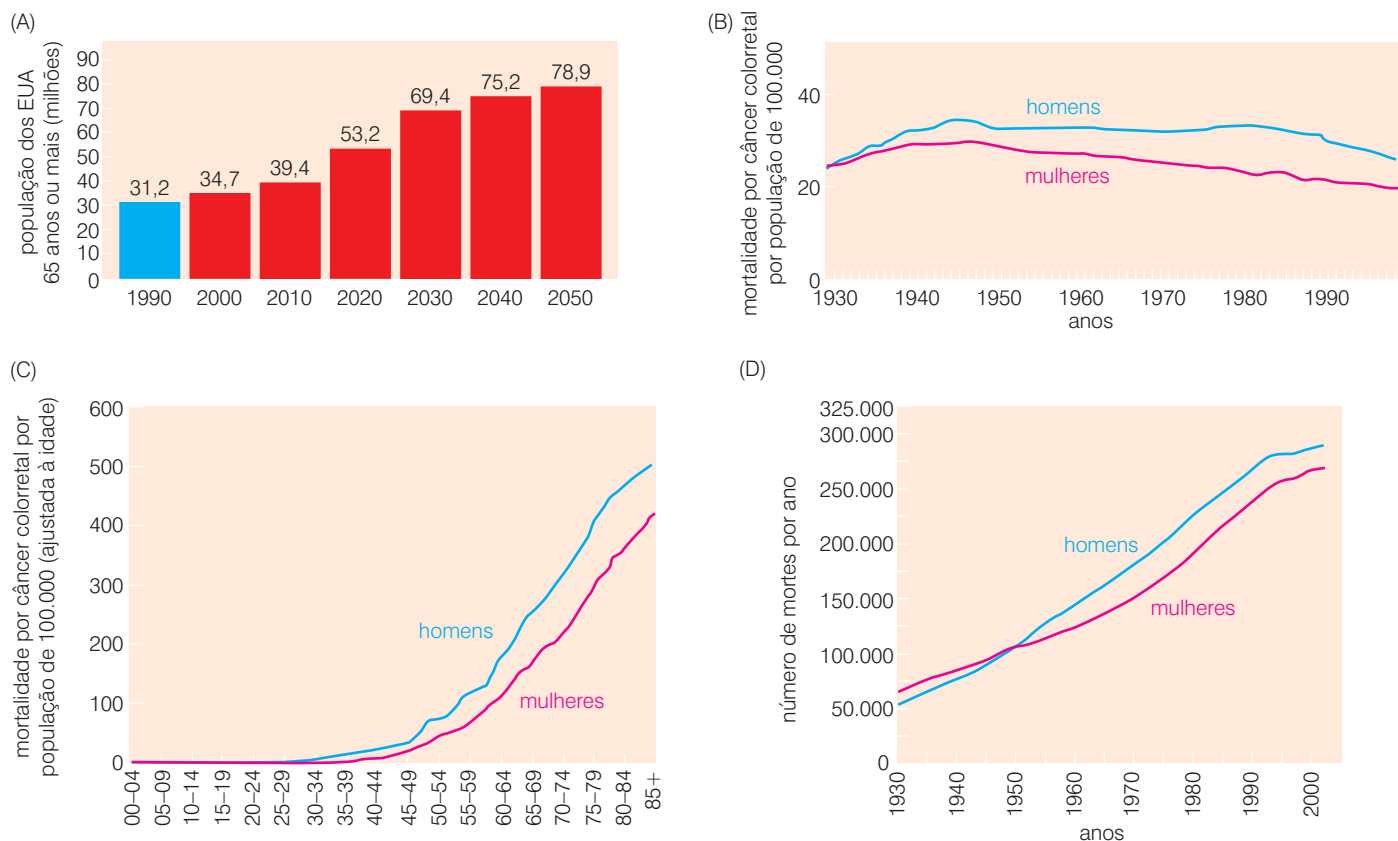


Figura 16.45 A demografia e epidemiologia do câncer (A) Devido a quedas bruscas na mortalidade na meia idade, populações em países industrializados estão envelhecendo rapidamente. Nos Estados Unidos, o número de indivíduos acima de 65 anos aumentou 11 vezes desde 1900, enquanto o número daqueles abaixo de 65 aumentou três vezes. Aumentos comparáveis na população mais velha provavelmente ocorrerão por todo o mundo durante as próximas gerações. (B) A porcentagem de morte, ajustada à idade, por câncer colorretal alterou apenas levemente durante várias décadas passadas. Outros cânceres importantes mostraram curvas similares. (C) Como inúmeras outras doenças, câncer é incomum cedo na vida ou durante a meia vida e então aumenta rapidamente. Mostrada aqui está a taxa de morte dependente da idade por câncer colorretal. (D) Por causa do (1) aumento do número de mais velhos de forma constante durante o século

passado, que continuará dessa forma (veja o painel A), (2) câncer ser uma doença de mais velhos (painel C), e (3) a taxa ajustada à idade da maioria dos cânceres ter sido relativamente constante durante várias décadas (como sugerido no painel B), o número absoluto de mortes anuais por causa de câncer aumentou dramaticamente durante os três quartos passados de século nos Estados Unidos. Uma vez que essas tendências provavelmente continuarão, o peso de casos de câncer nas sociedades industrializadas continuará a aumentar por várias décadas. (A, cortesia de D. Singer and R. Hodes, a partir de U.S. Bureau of the Census Projections of 1996; B, cortesia de M.J. Thun, a partir de Câncer Statistics, 2003, American Cancer Society; C, a partir de A. Jemal, T. Murray, E. Ward et al., *CA Câncer J. Clin.* 55:10-30, 2005; D, a partir de A. Jemal, E.M. Ward and M.J. Thun, in V. DeVita et al. (eds.), *Cancer: Principles and Practice of Oncology*, 7th ed. Philadelphia: Lippincott/Williams & Wilkins, 2004.)

16.46, percepções sobre a incidência de certos tipos de doenças neoplásicas são fortemente influenciadas pelas práticas de diagnóstico.

Para vários tipos de câncer, quanto mais se procura, mais se acha. Estatísticas como aquelas na Figura 16.46 sugerem que, no passado, vários cânceres permaneceram sem diagnóstico e assintomáticos, e que esses tumores estão contribuindo para a maior parte dos aumentos visíveis na incidência da doença, notavelmente de tumores comuns, como aqueles que surgem na mama e na próstata. (As principais exceções aqui são os cânceres relacionados ao uso do tabaco, cujo aumento da incidência é real e além de discussão, uma vez que as taxas de incidência são quase comparáveis com as taxas de mortalidade.) Tais estatísticas indicam que, para vários tipos de tumores, temos apenas uma pobre apreciação de quão grande é o número daqueles que realmente requerem tratamento (veja a Barra lateral 16.4).

Dados como aqueles na Figura 16.46 também questionam a noção (Capítulo 11), profundamente incrustada no pensamento de vários biólogos do câncer e oncologistas clínicos, de

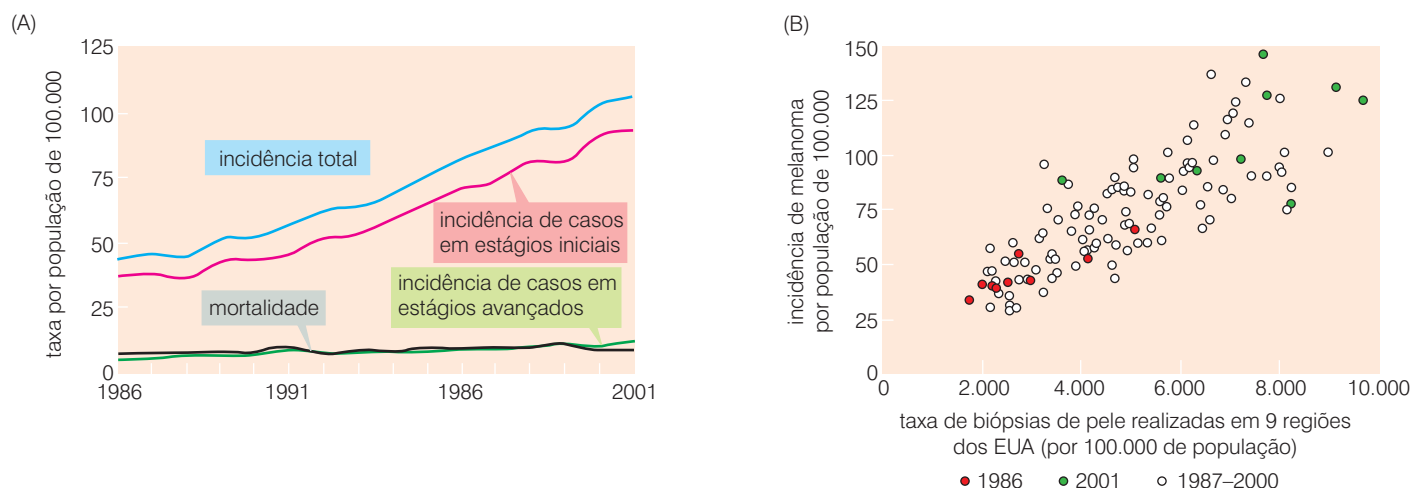


Figura 16.46 Incidência e mortalidade do melanoma A incidência de melanoma nos Estados Unidos aumentou em seis vezes durante a última metade do século, levantando a questão de se essa tendência criou um aumento comparável no número de casos que necessitam tratamento clínico agressivo. (A) O transtorno na incidência de melanoma (para as categorias de doenças localizadas de estágio inicial e disseminadas de estágio avançado, ambas diagnosticadas por biópsia de pele) em nove áreas dos Estados Unidos entre indivíduos acima dos 65 anos de idade indica um aumento dramático durante as duas décadas passadas na incidência da doença de estágio inicial e na incidência relativamente constante da doença de estágio avançado. A mortalidade ajustada por idade tem sido relativamente constante durante esses anos. (Melanoma é uma doença cuja incidência surge progressivamente com a idade, tornando este grupo de idade o que tem a incidência e a mortalidade mais altas a partir dessa doença.) Esses dados levantaram a questão de se a incidência real da doença de estágio inicial tem aumentado durante esse

período, ou se a incidência real tem sido relativamente constante e a incidência registrada dessa doença aumentou por causa das alterações nas práticas de triagem. (B) Se as taxas de incidência, como aqueles do painel A, são colocadas contra as taxas de triagem por melanoma em nove áreas dos estados Unidos, como registrado durante vários períodos, o gráfico resultante revela uma correlação próxima entre os dois. Isso fornece fortes indicações de que a incidência da doença é muito influenciada pelas práticas de diagnóstico. Então é possível que (1) a incidência verdadeira de melanomas que ameaçam a vida (painel A) não tenha alterado significativamente durante as últimas duas décadas passadas; ou que (2) a verdadeira incidência desses tumores aumentou, mas a intensificação da triagem manteve a taxa de mortalidade nos níveis observados há duas décadas pela permissão da remoção de tumores em estágios iniciais antes que eles progredissem para invasivos e metastáticos. (A partir de H.G. Welch, S. Woloshin and L.M. Schwartz, *BMJ* 331:481, 2005.)

Barra lateral 16.4 Qual é a verdadeira incidência dos cânceres que ameaçam a vida?

Para alguns, dados como aqueles mostrados na Figura 16.52 podem sugerir que a incidência ajustada pela idade de melanomas que ameaçam a vida não se alterou durante as últimas duas décadas, e que a triagem por melanomas, que é praticada cada vez mais nos países industrializados, apenas levou à descoberta de crescimentos que, em tempos anteriores, não teriam sido noticiados e nunca teriam progredido para um estado altamente maligno. Isso sugeriria que a triagem por melanoma, e, por extensão, por outras malignidades em estágio inicial, teria poucos efeitos benéficos em termos de redução de mortalidade.

Mas existe uma outra visão igualmente plausível: que a verdadeira incidência dos melanomas com potencial de se tornarem ameaçadores à vida tem aumentado, de fato, consistentemente nas décadas recentes (p. ex., como

uma consequência da exposição aumentada ao sol), e que a triagem preveniu um aumento associado na mortalidade, uma vez que ele frequentemente leva à remoção de tais crescimentos muito antes que eles tenham tempo de progredir para um estado altamente maligno. Em partes da Austrália, por exemplo, onde a triagem por melanomas tem sido praticada amplamente há três décadas, a mortalidade por melanoma ajustada pela idade tem realmente diminuído nos últimos anos. Significativamente, a mortalidade tem diminuído em grupos de pessoas que nasceram após 1950, quando o reconhecimento do perigo da radiação UV tornou-se conhecido. Mas mesmo essa estatística é sujeita a interpretações alternativas: a diminuição pode ter sido por causa da prevenção (na forma de loção protetora contra o sol e maiores proteções da pele ao ar livre) em vez de devida à triagem.

Em ambos os casos, está claro que as medidas existentes da incidência da doença para essa

e outras neoplasias relativamente comuns são altamente inexatas, o que complica muito o desenvolvimento de estratégias para reduzir a mortalidade relacionada ao câncer. Assim, na medida em que as tecnologias para detecção melhoram (veja a Figura 16.3), a proporção dos tumores descobertos que provavelmente se tornarão altamente malignos provavelmente diminuirá, e uma proporção aumentada de tumores será submetida à terapia quando nenhuma é justificada pelo curso natural desses crescimentos mais benignos. Essas tendências destacam os dilemas idênticos encarados por aqueles que estão envolvidos no desenvolvimento de vários tipos de terapia para o câncer: o número absoluto de casos que requerem tratamento é desconhecido, e é difícil distinguir com alguma certeza entre aqueles crescimentos que necessitam de um tratamento agressivo e aqueles que podem ser ignorados ou, no máximo, submetidos a “observação atenta”.

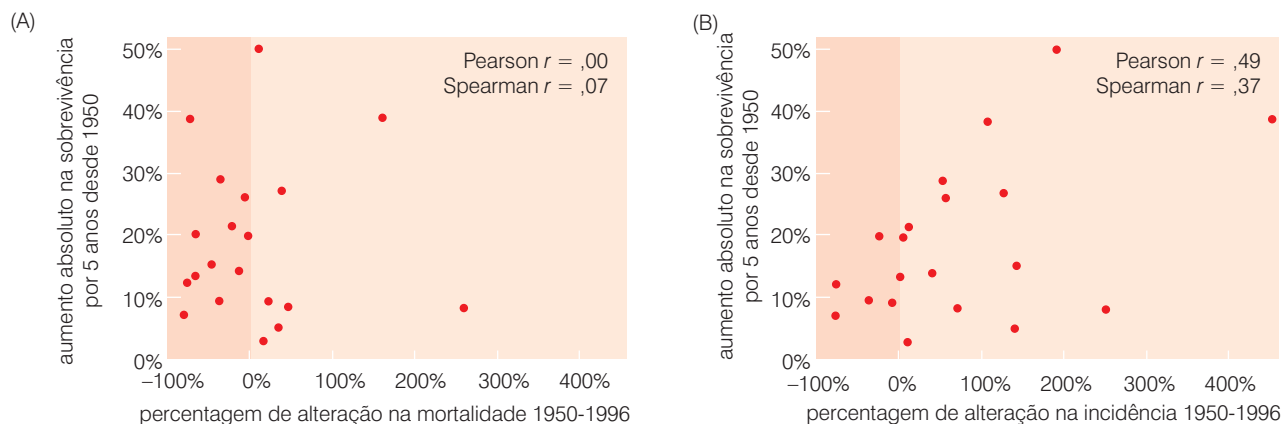


Figura 16.47 Incidência de câncer e sobrevivência desde 1950 nos Estados Unidos. Uma maneira de medir o sucesso terapêutico do tratamento de um certo tipo de tumor é determinar a porcentagem de pacientes que sobrevivem por cinco anos após o diagnóstico inicial. (A) Se a extensão do tempo de sobrevivência do paciente após o diagnóstico for uma reflexão do aumento da eficácia do tratamento, essa extensão deveria estar correlacionada com uma diminuição na mortalidade, por esse tipo de tumor, ajustada à idade durante o último meio século. Na verdade, como indicado aqui, não existe correlação entre esses dois parâmetros quando alterações nas taxas de sobrevivência por cinco anos de vários tumores sólidos são colocadas contra as alterações na mortalidade. (Note os coeficientes baixos de correlação, *acima, à direita*). (B) Em vez disso, existe uma correlação significativa entre alterações na sobrevivência por cinco anos e alterações na incidência da doença. Se a última é fortemente afetada por diagnóstico tendencioso (veja a Figura 16.46), então aumentos na sobrevivência por cinco anos se tornam muito difíceis de serem interpretados, uma vez que eles podem refletir amplamente a detecção de uma doença em um estágio mais inicial do curso clínico natural. (A partir de H.G. Welch, L.M. Schwartz and S. Woloshin, *J. Am. Med. Assoc.* 282:2976-2978, 2000.)

que os crescimentos benignos estão em perigo de se tornarem, mais cedo ou mais tarde, altamente malignos. A epidemiologia do câncer agora nos confronta com uma possibilidade alternativa: vários tipos de tumores em estágio inicial, incluindo aqueles associados a tipos de câncer que ocorrem normalmente, provavelmente não progredirão para uma malignidade de alto grau durante um período de vida médio. Infelizmente, estamos apenas começando a aprender como segregar aqueles tumores que estão verdadeiramente merecendo um tratamento agressivo daqueles que não (veja, por exemplo, a Figura 16.4).

Para a segunda questão, que negocia com a efetividade das terapias atuais para o câncer, nossas percepções estão fortemente influenciadas pelo fato de que as pessoas estão vivendo por mais tempo com seus cânceres. Isso fornece uma medida de segurança renovada que o progresso está fazendo. Entretanto, algumas dessas melhorias percebidas na terapia podem, mais uma vez, ser artefatos de uma triagem aumentada e de técnicas de detecção mais sensíveis que descobrem os tumores relativamente cada vez mais cedo no seu desenvolvimento, dando ao paciente anos adicionais de sobrevivência antes que a progressão do tumor avance pelo seu curso natural, com ou sem tratamento (Figura 16.47). Essas lógicas forçam a conclusão de que a eficácia das terapias podem ser medidas acuradamente apenas por experimentos bem-controlados: comparações de várias populações de pacientes que estão afligidas pela mesma malignidade e expostas em paralelo a diferentes agentes ou protocolos de tratamento. Tais comparações lado a lado têm, até recentemente, gerado apenas ganhos incrementais no tratamento da maioria dos tumores sólidos (veja, por exemplo, a Figura 16.22), mas isso está começando a mudar, à medida que novas drogas e anticorpos monoclonais são introduzidos na clínica.

Gleevec, Avastin e Rituxan (veja as Seções 13.10 e 15.20) vêm à mente nesse ponto. A maior esperança é que agentes como esses sejam os precursores de dúzias e, finalmente, centenas de drogas específicas muito eficazes. Esforços para desenvolver tais drogas altamente específicas, incluindo anticorpos, irão com certeza gerar números continuamente aumentados de agentes anticâncer aprovados em cada ano que se passa. O uso de procedimentos monitorados por computador, como triagem em larga escala (HTS), automatizou a determinação das estruturas de moléculas-alvo, e o desenho auxiliado por computador de moléculas de drogas (Figura 16.48) já começou a colocar essa tendência em movimento.

Tradicionalmente, novos grupos têm sido avaliados como agentes únicos durante o desenvolvimento pré-clínico e testes clínicos de Fase I. Essa prática contrasta com a crença crescente dos pesquisadores do câncer de que a maioria das monoterapias provavelmente não geram tratamentos curativos e que, com raras exceções, respostas clínicas verdadeiramente bem-sucedidas dependerão do uso de combinações de drogas anticâncer. Parte do seu racional deriva da plasticidade genética conhecida de populações de células tumorais. Como aprendemos no Capítulo 12, genomas de células tumorais são geneticamente instáveis, e o grande número de células neoplásicas dentro dos tumores está continuamente produzindo subclones variantes. Alguns desses podem, por casualidade, ter adquirido os meios para resistir à morte pelos agentes terapêuticos, e, uma vez confrontadas com um agente desses, essas variantes terão sucesso mesmo na medida em que a massa de células em um tumor esteja sendo eliminada.

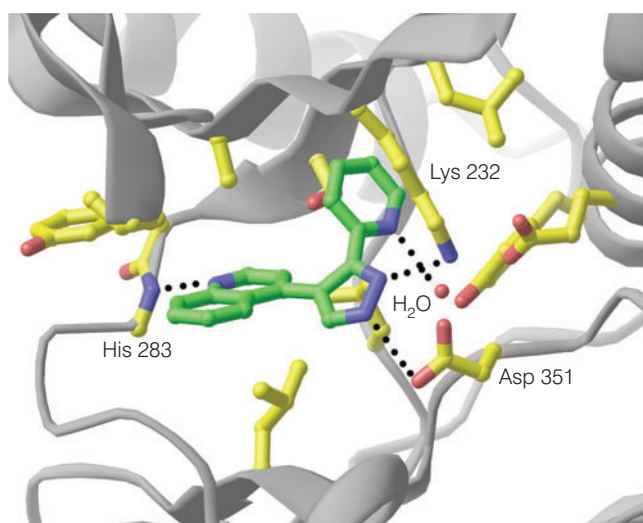


Figura 16.48 Triagem virtual – o desenho de drogas no computador. A triagem em larga escala gerou um grande número de drogas candidatas altamente atrativas, várias das quais avançaram para um teste clínico. No futuro, entretanto, muito dessa triagem, que é de alto custo, pode ser evitada pelo desenvolvimento de algoritmos potentes que permitam aos farmacologistas desenhar drogas usando as estruturas conhecidas das proteínas-alvo. O desenvolvimento da droga aqui ilustrada começou com um composto que mostrava uma afinidade muito fraca (IC_{50} de 30 μ M) para o sítio de ligação a ATP do receptor TGF- β tipo I da cinase. Pesquisadores então procuraram em um banco de dados de 200 mil compostos conhecidos por compostos que compartilhavam alguma característica química com o composto inicial e obedeciam aos obstáculos impostos pela estrutura conhecida do sítio de ligação a ATP. Isso gerou as estruturas de 87 espécies químicas que satisfazem tal critério e que foram então triadas por meio de técnicas bioquímicas convencionais. Uma dessas, chamada de HTS466284, mostrada aqui, se assenta no sítio de ligação a ATP do receptor TGF- β tipo I da cinase, exibe um IC_{50} de 27 nM e, assim, funciona como um potente inibidor da sinalização por TGF- β . Significativamente, um outro grupo de pesquisa, que trabalha independentemente, chegou a uma molécula inibidora idêntica usando triagem convencional em larga escala. As pontes de hidrogênio estão indicadas por *linhas pontilhadas*. (A partir de J. Singh, C.E. Chuaqui, P.A. Boriack-Sjodin et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 13:4355-4359, 2003.)

Tais pensamentos, originalmente inspirados pelo comportamento das populações de bactérias tratadas com antibióticos, precisam de terapias que envolvem o tratamento simultâneo com dois ou mais agentes que têm mecanismos bem diferentes de ação. Se a probabilidade de resistência adquirida para matar células por um único agente é pequena (p. ex., 1 em 10^5), a probabilidade de clones celulares adquirirem resistência a dois agentes é muito menor, possivelmente o quadrado dessa probabilidade (1 em 10^{10}). O último número pode ser maior do que o número total de células em um tumor, tornando improvável que qualquer célula única seja capaz de resistir simultaneamente à morte por ambos os agentes. (A existência de resistência a múltiplas drogas enfraquece um pouco esse argumento.)

A lógica das terapias com múltiplas drogas é sustentada pelas informações acumuladas sobre tumorigênese em múltiplas etapas, na qual certos fenótipos de células cancerosas podem ser obtidos pelas ações combinadas de várias alterações genéticas e/ou epigenéticas (veja a Figura 11.43). Um exemplo é fornecido por tumores nos quais a via de sinalização Ras foi ativada e as vias supressoras de tumores p53 e PTEN foram inativadas. Cada uma dessas mudanças, à sua própria maneira, reduz a chance de uma célula cancerosa poder ser empurrada para a beira da apoptose. Essa sobreposição da função apoptótica pode requerer um tratamento que tenha como alvo todas as três vias de sinalização, com o objetivo de destruir a célula cancerosa. (De maneira interessante, um inibidor de tirosina cinase de baixo peso molecular pode atuar sinergisticamente com anticorpos monoclonais sobre um alvo em comum, o receptor EGF, indicando que os benefícios terapêuticos podem vir, com frequência, a partir de combinações surpreendentes de agentes.)

No momento, a escolha de drogas a serem usadas sozinhas ou em combinação é inspirada pela intuição biológica ou por suposições pouco informadas. Cada vez mais na próxima década, estratégias para organizar protocolos de tratamentos com múltiplas drogas serão influenciadas por nossa compreensão rápida da evolução do desenho do circuito de sinalização dentro das células humanas e por diagnósticos moleculares que mostram como certas vias de sinalização têm sido perturbadas em alguns tumores e não em outros. A genômica funcional usando arranjos de expressão gênica já começou a mudar isso, como indicado pelas análises dos grandes linfomas difusos de células B descritas neste capítulo (Figura 16.5).

E se as forças reais de uma droga candidata forem apenas notáveis quando ela é utilizada em combinação com várias outras? Em teoria, vários agentes anticâncer deveriam cair nessa categoria, sugerindo que várias drogas candidatas verdadeiramente úteis foram descartadas no passado e que várias outras sofrerão esse fato no futuro, simplesmente porque a sua verdadeira utilidade como agente de combinação nunca será testada. Mais uma vez, espera-se que a nossa compreensão cada vez maior sobre o circuito de sinalização subcelular melhore essa situação (mas veja a Barra lateral 16.5).

Barra lateral 16.5 O não-incentivo legal e financeiro diminui a chance de testar drogas em combinações Atualmente, as dificuldades biológicas de testar drogas candidatas em combinação com outras são compostas por forças econômicas que freqüentemente não dão incentivo a companhias farmacêuticas para testar as suas próprias drogas em combinação com aquelas produzidas pelos seus concorrentes. As regulamentações de patentes também têm desencorajado certos usos de compostos patenteados por empresas que estão em competição direta com o proprietário da patente.

No passado, as dificuldades para organizar testes clínicos iniciais com múltiplas drogas eram também combinadas, nos Estados Unidos, à insistência da Food and Drug Administration (FDA) de que a eficácia clínica dos candidatos a drogas deveria ser demonstrada quando eles eram usados como monoterapias. Mas isso começou a mudar. Por exemplo, Erbitux, um anticorpo monoclonal anti-receptor de EGF (Barra lateral 15.4), foi aprovado inicialmente para uso juntamente com irinotecan, pois os dois usados juntos geraram respostas muito melhores do que o irinotecan sozinho. (Irinotecan é um agente citotóxico mais tradicional que funciona como um inibidor da topoisomerase I.)

A descoberta de células-tronco tumorais, como descrito no Capítulo 11, cria outro grande desafio para o desenvolvimento de drogas anticâncer. Lembre que a auto-renovação das células-tronco tumorais pode semear novos tumores, enquanto a sua progênie amplificadora em trânsito, muito mais numerosa, com capacidade de auto-renovação limitada, não pode. Esse esquema de organização foi inicialmente demonstrado em leucemias, carcinomas de mama e tumores cerebrais, mas, a longo prazo, provavelmente descreverá a organização da maioria dos outros tipos de tumores humanos também.

Tal organização hierárquica funcionando dentro dos tumores alimenta importantes implicações para o desenvolvimento de drogas anticâncer. Tradicionalmente, a validação clínica da eficácia terapêutica dessas drogas dependeu de demonstrações da sua habilidade em parar um crescimento adicional de tumores ou em causar diminuições significativas no tamanho do tumor. Vários agentes antitumorais sendo testados em testes clínicos podem encolher massas tumorais pela eliminação de populações de células amplificadoras em trânsito, que constituem uma grande massa de células neoplásicas nesses crescimentos. Entretanto, se as células-tronco tumorais de auto-renovação são deixadas sem serem tocadas por essas drogas (veja a Figura 16.30), o tumor tem uma alta probabilidade de crescer novamente, levando, mais cedo ou mais tarde, a reincidência clínica.

Essa organização das células neoplásicas dentro de um tumor significa que remissões duráveis e curas só podem derivar de terapias que golpeiam o coração do tumor – as células-tronco tumorais de auto-renovação. Atualmente, ensaios para a presença dessas células na maioria dos tipos de tumores essencialmente não existem. Portanto, esforços no desenvolvimento de drogas estão amarrados porque eles não têm uma ferramenta-chave analítica necessária para o desenvolvimento de terapias verdadeiramente eficazes.

Um problema maior ainda não-resolvido diz respeito aos modelos biológicos de tumores humanos que são usados no desenvolvimento pré-clínico de drogas. Alguns modelos de xenotransplantes de câncer humano são úteis na predição do comportamento dos tumores encontrados na clínica oncológica, mas vários não são (veja a Barra lateral 13.2). O desenvolvimento de modelos pré-clínicos preditivos de câncer humano, se existirem, certamente reduzirão o custo do desenvolvimento de drogas e, muito possivelmente, podem até evitar certos testes clínicos da fase inicial. No momento, o desenvolvimento de modelos de tumores animais, verdadeiramente úteis, é um pouco mais do que uma esperança irreal.

As células não-neoplásicas do estroma dentro de um tumor podem ser os principais determinantes da responsividade para a maioria das terapias com drogas; apesar disso, as suas contribuições não são reconhecidas no desenho de vários modelos pré-clínicos de câncer humano. No Capítulo 13, aprendemos, por exemplo, que as células mais radiosensíveis em alguns tumores são provavelmente as células endoteliais que formam a sua neovascularura (veja a Figura 13.48). Além disso, parece cada vez mais provável que vários quimioterápicos anticâncer amplamente usados tenham fortes efeitos sobre as células endoteliais associadas a tumores que nunca foram suspeitas no passado. De fato, alguns pesquisadores estão redesenhando protocolos de tratamento quimioterapêutico com o objetivo de otimizar seus efeitos tóxicos sobre a neovascularura associada a tumor. O reconhecimento dessas duas classes de células – células-tronco cancerosas e células do estroma de tumores – como alvos biológicos criticamente importantes de quimioterapia certamente modificarão a completa paisagem do campo do desenvolvimento de drogas.

O último teste de várias drogas candidatas anticâncer vem apenas quando elas são testadas em um número substancial de pacientes de câncer. Nesse estágio, o desenvolvedor da droga com freqüência é confrontado pelo dilema de não saber quais tipos de tumores provavelmente responderão. Deveria uma droga candidata ser testada em pacientes que sofrem de carcinomas pancreáticos ou neuroblastomas? As lesões moleculares descobertas nesses e em outros tipos de células cancerosas pareceriam ser indicadores muito úteis que podem ser usados para informar essa decisão. Mas, bastante freqüentemente, certos tipos de tumores respondem por razões que não podem ser preditas pelos genes mutantes e pelas vias de sinalização desreguladas sabidamente presentes nesses crescimentos e, assim, as escolhas de pacientes recrutados para os testes clínicos são arbitrárias e abaixo do adequado. Mais uma vez, podemos apenas

esperar que a nossa percepção cada vez maior sobre as etiologias moleculares de vários cânceres forneça linhas de direção verdadeiramente úteis para os oncologistas prosseguirem.

Nos final das contas, o maior desafio do desenvolvimento atual de drogas é demonstrar a eficácia em longo prazo: uma droga que está sendo testada tem efeitos significativos na extensão da expectativa de vida de pacientes com câncer e deveríamos ousar esperar que ela possa alcançar curas duráveis? Algumas populações de células cancerosas podem desenvolver mecanismos de evasão a drogas pelo aumento das suas defesas antiapoptóticas. Todavia, outras podem perder controles de pontos de checagem que previamente as tornaram sensíveis a certos tipos de tratamentos com drogas. Tumores formados a partir de células cancerosas cuja morte foi previamente alcançada pelo ataque mediado por anticorpos pode simplesmente regular para baixo a expressão do antígeno reconhecido pelo anticorpo terapêutico. Um número significativo de células cancerosas pode desenvolver resistência a uma droga por meio de estratégias que previnem o acúmulo intracelular de drogas. No momento, ainda não está claro se um dia seremos capazes de desenvolver estratégias de tratamento que antecipem a plasticidade e a evasividade das células cancerosas, permitindo que desenvolvamos curas definitivas em longo prazo de malignidades que foram incuráveis por muito tempo.

Independentemente do desafio do desenvolvimento e testes de drogas para o câncer estão os problemas mais transcendentais criados pela biologia complexa dos cânceres humanos: diferentes tipos de drogas precisam ser desenvolvidos para diferentes classes de câncer ou um pequeno número de tratamentos irão encontrar uma ampla aplicabilidade? Diferentes tumores dentro de uma dada classe (p. ex., carcinomas de cólon) requerem tratamentos distintos feitos sob medida com base nos seus genótipos e fenótipos particulares? Um dia seremos capazes de prover uma “medicina molecular personalizada” a um custo que pode ser pago, no qual as características detalhadas de cada tumor de paciente e constituição genética informam o desenho de uma terapia personalizada?

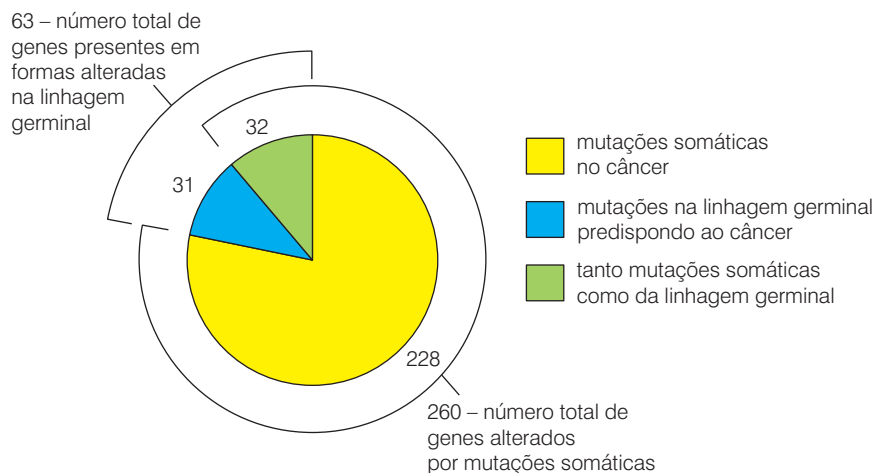
Alguma vez serão desenvolvidas drogas antineoplásicas que têm efeitos letais sobre crescimentos malignos enquanto têm mínimos efeitos colaterais sobre tecidos normais? E os desenhistas de drogas deveriam responsabilizar-se para desenvolver drogas anticâncer que mantêm os tumores sob controle em vez de tentar destruí-los? O objetivo de curar totalmente vários tipos de tumores pode muito bem ser um objetivo inalcançável, e, para esses tumores, reduzir o câncer para uma doença crônica mas suportável pode ser um objetivo mais realizável. (Esse é o pensamento de pesquisadores que desenvolvem novos tipos de terapias anti-HIV.)

Um censo em 2004 de genes mutados nos genomas de células cancerosas humanas “pescou” 291 genes distintos – quase 1,5% dos genes presentes no genoma humano (Figura 16.49). Desses, 228 estão envolvidos em câncer apenas por mutação somática, enquanto 32 estão envolvidos por mutações em alelos, que são adquiridas tanto somaticamente como pela linhagem germinal. Essa lista sem dúvida crescerá; por exemplo, genes cujo envolvimento no câncer só é evidente a partir da metilação dos seus promotores nem foram incluídos nesse censo.

Esse censo fornece vários alvos promissores para o desenvolvimento de drogas para pesquisadores envolvidos no desenvolvimento de novos tipos de terapias anticâncer. Ao mesmo tempo, ele representa uma complexidade confusa. Alguns desses genes são mutados apenas em raros cânceres, e os custos para desenvolver drogas terapêuticas direcionadas contra seus produtos proteicos provavelmente nunca serão recuperados por vendas. A maior parte das proteínas mutantes codificadas contribui de maneira ainda obscura para o crescimento neoplásico de vários tipos de células humanas cancerosas. Como alguma vez relacionaremos papéis-chave com cada um dos aproximadamente 300 genes mutantes que já são conhecidos ou suspeitos de estarem envolvidos na patogênese de vários cânceres? Nossos métodos atuais de assimilar e interpretar dados sobre os genomas de células humanas cancerosas e vias de sinalização não são adequados para a tarefa.

Vários pesquisadores do câncer gostariam de compreender inteiramente um sistema biológico, como uma célula de câncer viva, em vez dos seus componentes funcionais individuais. Aos seus olhos, a biologia reducionista, que enfoca o indivíduo, teve seus dias, e chegou a vez das

Figura 16.49 Alvos para o desenvolvimento futuro de drogas para o câncer Uma análise da literatura sobre o câncer, em 2004, revelou ao menos 291 genes que foram implicados como contribuintes casuais de cânceres humanos. Desses, sabe-se que 260 estão presentes, como alelos mutados somaticamente, nos genomas de células cancerosas humanas. Entretanto, a maior parte dos últimos estão mutadas somaticamente nos genomas de tumores mesenquimais (leucemias, linfomas e sarcomas), deixando apenas 77 genes que são mutantes para os tumores muito mais comuns dos tipos restantes. Dado o número de genes para cinase presentes no genoma humano, espera-se que seis cinases estejam entre os 291 genes associados a câncer, dos quais 27 estão realmente presentes nessa lista. Ao contrário, esperava-se que os receptores, mais numerosos, acoplados à proteína G (GPCRs), gerassem no mínimo oito genes associados ao câncer, mas apenas um estava presente. (Cortesia de M.R. Stratton.)



vastas quantidades de informação conhecidas sobre esses componentes serem integradas nos *sistemas* complexos de interação cujo comportamento pode ser predito pela bioinformática.

Sucessos nesses esforços, envolvendo a nova disciplina de “biologia de sistemas”, certamente beneficiarão a pesquisa sobre o câncer. Imagine um dia – ainda daqui há anos – em que as respostas biológicas de várias células humanas, normais ou malignas, poderão ser preditas por modelos matemáticos dessas células e seus circuitos controle internos. Tais avanços tornarão várias práticas correntes na biologia experimental, incluindo várias etapas do desenvolvimento de drogas, desnecessárias. Se isso alguma vez se tornar possível, o desenvolvimento de drogas será mais uma matéria de bioinformática do que de biologia de bancada do laboratório.

Mas, até o momento, a maior parte disso permanece um sonho, muito além no futuro. Até agora, no mínimo, precisamos lutar com as amargas realidades do desenvolvimento de drogas, os modelos animais inadequados, nossa ignorância sobre o comportamento do circuito regulador das células e as complexidades biológicas confusas do câncer humano.

Conceitos-chave

- A ciência da oncologia molecular revelou dúzias de proteínas cujo mau funcionamento contribui para a formação e manutenção de tumores.
- Entre essas proteínas, estão aquelas cujas propriedades moleculares as tornam alvos atraentes para novos agentes terapêuticos anticâncer, como anticorpos monoclonais ou drogas de baixo peso molecular.
- Proteínas que são alvos atraentes para o ataque por anticorpos estão invariavelmente localizadas na superfície da célula ou no espaço extracelular.
- A maioria das proteínas que é alvo atraente para o ataque de compostos de baixo peso molecular são enzimas que possuem fendas catalíticas promissoras para o desenvolvimento de drogas.
- Avanços recentes expandiram o espectro de alvos promissores para o desenvolvimento de drogas para incluir certas interações proteína-proteína que também podem ser inibidas por drogas de baixo peso molecular.
- Devem ser escolhidos alvos protéicos cuja inativação leve ao encerramento da proliferação de células tumorais ou para sua morte por apoptose.
- As drogas anticâncer desenvolvidas com maior sucesso até agora têm sido aquelas que interferem no funcionamento de várias cinases promotoras do crescimento e da sobrevivência, especificamente, tirosina cinases associadas a receptores.

- Drogas com sucesso devem ter um alto índice terapêutico, farmacocinética e farmacodinâmica adequada e mínimos efeitos colaterais sobre os principais sistemas de órgãos.
- Estudos de drogas em testes de Fases I, II e III são essenciais, porque estudos pré-clínicos sobre a eficácia e tolerabilidade de drogas são pouco preditivos sobre o comportamento das drogas em humanos.
- As indicações para o uso clínico de certas drogas podem ser baseadas no comportamento conhecido das proteínas-alvo nas células cancerosas (como é o caso do Gleevec) ou, em vez disso, depender fundamentalmente de testes empíricos, de como vários tipos de tumores humanos respondem ao tratamento (como com Velcade).
- A estratificação de tumores visivelmente similares em subclasses limitadas ajuda muito os pesquisadores e médicos a encontrar drogas para os tipos de células tumorais específicas que elas podem tratar com maior eficácia.
- O grande benefício de certas drogas, como o Gleevec, pode finalmente ser provado derivar da sua ampla especificidade-alvo, permitindo que elas sejam usadas em uma grande variedade de cânceres.

Questões elaboradas

1. Quais são as vantagens e desvantagens terapêuticas de usar uma droga que afeta um amplo espectro de alvos moleculares?
2. Dada a coleção ampla e heterogênea de moléculas de sinalização que têm sido retratadas neste livro desempenhando papéis-chave na patogênese de vários cânceres, quais classes você acha que poderiam vir a ser os alvos para o desenvolvimento de um novo espectro de terapias anticâncer ao lado das muito estudadas cinases?
3. Como os tumores que se iniciaram pela formação de um certo oncogene poderiam se tornar independentes desse oncogene mais tarde na progressão tumoral?
4. Quais estratégias você implementaria mediante o achado de que células dentro de um tumor se tornaram resistentes a uma terapia com drogas após um longo tratamento?
5. Tendo concluído que produtos naturais representam uma fonte rica de drogas anticâncer em potencial, quais obstáculos poderiam limitar a procura e os testes de tais drogas?
6. Quais os obstáculos estão no caminho do desenvolvimento de drogas para tumores que representam apenas uma parte muito pequena dos cânceres totais carregados pela população?
7. Na oncologia clínica do futuro, quais tipos de informação poderiam ser incluídos na montagem de terapias anticâncer que são feitas sob medida especificamente para responder a um determinado tumor de um paciente?
8. Quais estratégias você proporia para desenvolver modelos pré-clínicos de tumores humanos que são altamente úteis na predição das respostas dos pacientes a drogas candidatas?

Leitura adicional

- Adams J (2004) The proteasome: a suitable antineoplastic target. *Nat. Rev. Cancer* 4, 349–360.
- Al-Hajj M, Becker MW, Wicha M et al. (2004) Therapeutic implications of cancer stem cells. *Curr Opin. Genet. Dev.* 14, 43–47.
- Baselga J & Arteaga CL (2005) Critical update and emerging trends in epidermal growth factor receptor targeting in cancer. *J. Clin. Oncol.* 23, 2445–2459.
- Bernardi R & Pandolfi PP (2003) Role of PML and the PML-nuclear body in the control of programmed cell death. *Oncogene* 22, 9048–9057.
- Brunner RB, Hahn SM, Gupta AK et al. (2003) Farnesyltransferase inhibitors: an overview of the results of preclinical and clinical investigations. *Cancer Res.* 63, 5656–5668.
- Chabner BA & Roberts TG Jr (2005) Chemotherapy and the war on cancer. *Nat. Rev. Cancer* 5, 65–72.
- Chen ZJ (2005) Ubiquitin signalling in the NF- κ B pathway. *Nat. Cell Biol.* 7, 758–765.
- Cleator S & Ashworth A (2004) Molecular profiling of breast cancer: clinical implications. *Brit. J. Cancer* 90, 1120–1124.
- Courtneidge SA (2003) Escape from inhibition. *Nature* 422, 827–828.
- Downward J (2003) Targeting Ras signalling pathways in cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* 3, 11–22.
- Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ et al. (2001) Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* 344, 1031–1037.
- Duensing A, Medeiros F, McConarty B et al. (2004) Mechanisms of oncogenic KIT signal transduction in primary gastrointestinal stromal tumors (GISTs). *Oncogene* 23, 3999–4006.
- Ehrlich LJ, Jorgensen HG, Mountford JC and Holyoake TL, (2005) Punish the parent not the progeny. *Blood* 105, 1862–1866.

- Felsher DW (2004) Reversibility of oncogene-induced cancer. *Curr Opin. Genet. Dev.* 14, 37–42.
- Futreal PA, Coin L, Marshall M et al. (2004) A census of human cancer genes. *Nat. Rev. Cancer* 4, 177–183.
- Gibbs JB (2000) Mechanism-based target identification and drug discovery in cancer research. *Science* 287, 1969–1973.
- Gills JJ, Granville CA & Dennis PA (2004) Targeting aberrant signal transduction pathways in lung cancer. *Cancer Biol. Ther.* 3, 147–155.
- Gingras A-C, Raught B & Sonenberg N (2001) Regulation of translation initiation by FRAP/mTOR. *Genes Dev.* 15, 807–826.
- Guertin DA & Sabatini DM (2005) An expanding role for mTOR in cancer. *Trends Mol. Med.* 11, 353–361.
- Hideshima T (2002) NF-kappa B as a therapeutic target in multiple myeloma. *J. Biol. Chem.* 277, 16639–16647.
- Hingorani SR & Tuveson DA (2003) Targeting oncogene dependence and resistance. *Cancer Cell* 3, 414–417.
- Ince TA & Weinberg RA (2002) Functional genomics and the breast cancer problem. *Cancer Cell* 1, 15–17.
- Kamb A. (2005) What's wrong with our cancer models? *Nat. Rev. Drug Discov.* 4, 161–165.
- Klein S, McCormick F & Levitzki A (2005) Killing time for cancer cells. *Nat. Rev. Cancer* 5, 573–580.
- Kloog Y & Cox AD (2004) Prenyl-binding domains: potential targets for Ras inhibitors and anti-cancer drugs. *Semin. Cancer Biol.* 14, 253–261.
- Lynch TJ, Bell DW, Sordella R et al. (2004) Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to Gefitinib. *N. Engl. J. Med.* 350, 2129–2139.
- McCormick F (2001) Cancer gene therapy: fringe or cutting edge? *Nat. Rev. Cancer* 1, 130–141.
- Mendelsohn J & Baselga J (2003) Status of epidermal growth factor receptor antagonists in the biology and treatment of cancer. *J. Clin. Oncol.* 21, 2787–2799.
- Nahta R, Hortobágyi GN & Esteva FJ (2003) Growth factor receptors in breast cancer: potential for therapeutic intervention. *Oncologist* 8, 5–17.
- Piazza F, Gurrieri C & Pandolfi PP (2001) The theory of APL. *Oncogene* 20, 7216–7222.
- Ramaswamy S & Golub TR (2002) DNA microarrays in clinical oncology. *J. Clin. Oncol.* 20, 1932–1941.
- Rothenberg ML, Carbone DP & Johnson DH (2003) Improving the evaluation of new cancer treatments: challenges and opportunities. *Nat. Rev. Cancer* 3, 303–309.
- Salesse S & Verfaillie CM (2002) BCR/ABL: from molecular mechanisms of leukemia induction to treatment of chronic myelogenous leukemia. *Oncogene* 21, 8547–8559.
- Sawyers CL (1999) Chronic myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* 340:1330–1340.
- Sawyers CL (2003) Opportunities and challenges in the development of kinase inhibitor therapy for cancer. *Genes Dev.* 17, 2998–3010.
- Sawyers C (2004) Targeted cancer therapy. *Nature* 432, 204–207.
- Schlessinger J (2005) SU11248: Genesis of a new cancer drug. *The Scientist* 19, 17–18.
- Scott MP (2003) A twist in hedgehog's tale. *Nature* 425, 780–782.
- Sebolt-Leopold JS & Herrera R (2004) Targeting the mitogen activated protein kinase cascade to treat cancer. *Nat. Rev. Cancer* 4, 937–947.
- Sebt S & Der CJ (2003) Searching for the elusive targets of farnesyl-transferase inhibitors. *Nat. Rev. Cancer* 3, 945–951.
- Segal E, Friedman N, Kaminski N et al. (2005) From signatures to models: understanding cancer using microarrays. *Nat. Genet.* 37:S38–S45.
- Shah NP & Sawyers CL (2003) Mechanisms of resistance to ST1571 in Philadelphia chromosome-associated leukemias. *Oncogene* 22, 7389–7395.
- Shawver LK, Shamon D & Ullrich A (2002) Smart drugs: tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy. *Cancer Cell* 1, 117–123.
- Staudt LM (2003) Molecular diagnosis of the hematologic cancers. *N. Engl. J. Med.* 348, 1777–1785.
- Strausberg RL, Simpson AJ, Old LJ & Riggins GJ (2004) Oncogenomics and the development of new cancer therapies. *Nature* 429, 469–474.
- Weigelt B, Peterse JL & van't Veer LJ (2005) Breast cancer metastasis: markers and models. *Nat. Rev. Cancer* 5, 591–602.
- Vande Woude GF, Kelloff GJ, Ruddon RW et al. (2004) Reanalysis of cancer drugs: old drugs, new tricks. *Clin. Cancer Res.* Voorhees PM, Dees EC, O'Neil B & Orlowski RZ (2003) The proteasome as a target for cancer therapy. *Clin. Cancer Res.* 9, 6316–6325.
- Zwick E, Bange J & Ullrich A (2002) Receptor tyrosine kinases as targets for anticancer drugs. *Trends Mol. Med.* 8, 16–23.

Abreviaturas

A	(1) adenina; (2) adenosina	CAD	DNase ativada por caspase
ABC	subtipo de DLBCL ativado, semelhante à célula B	CAF	fibroblasto associado a carcinoma
ABH	homólogo a alkB	CAK	cinase ativadora de CDK
Abl	oncoproteína do vírus da leucemia Abelson	CalB	domínio de ligação a cálcio-fosfolípido
ACT	transferência de célula adotiva	cAMP	monofosfato de adenosina cíclico
ACTH	hormônio adrenocorticotrópico	CASP	gene codificante para caspase
ADCC	citotoxicidade celular dependente de anticorpo	CBP	proteína ligadora ao elemento de resposta ao AMP cíclico
AEV	vírus da eritroblastose aviária	CCK	colecistoquinina
AFB1	aflatoxina B1	CDC	citotoxicidade dependente de complemento
Ag	antígeno	CDH1	E-caderina
AID	citidina deaminase induzida por ativação	CDK	cinase dependente de ciclina
AIDS	síndrome da imunodeficiência adquirida	Cdkl	inibidor de CDK
ALL	leucemia linfocítica (ou linfoblástica) aguda	cDNA	cópia de DNA complementar ao mRNA
ALT	alongamento alternativo dos telômeros	CEA	antígeno carcinoembrionário
ALV	vírus da leucose aviária	CEF	fibroblasto de embrião de galinha
AML	leucemia mielogenosa aguda	CEP	progenitora endotelial circulante (célula)
AMP	monofosfato de adenosina	CGH	hibridização genômica comparativa
AMV	vírus da mielocitomatose aviária	ChIP	imunoprecipitação de cromatina
Ang	angiopoietina	CHOP	ciclofosfamida, doxorrubicina, vincristina e prednisona (protocolo de quimioterapia)
AP	(1) apurínica; (2) apirimidínica	CI	intervalo de confiança
Apaf-1	fator 1 apoptótico ativado por protease	CIITA	transativador de classe II (fator de transcrição)
APC	(1) célula apresentadora de antígeno; (2) complexo promotor de anáfase; (3) polipose adenomatosa	CIN	(1) neoplasia intra-epitelial cervical; (2) instabilidade cromossomal
APE	(1) endonuclease apurínica; (2) endonuclease apirimidínica	CIS	carcinoma <i>in situ</i>
APL	leucemia promielocítica aguda	CKII	caseína cinase II
ARF	fase de leitura alternativa (proteína)	CML	leucemia mielogenosa crônica
asmase	esfingomielinase ácida	CMV	citomegalovírus
AT	ataxia telangiectasia (síndrome)	CNL	leucemia neutrofílica crônica
ATM	mutado na ataxia telangiectasia	CNS	sistema nervoso central
ATP	trifosfato de adenosina	COX-2	cicloxigenase-2
ATR	cinase relacionada à ATM	CPD	dímero de pirimidina ciclobutano
ATRA	ácido retinóico completamente <i>trans</i>	CPE	efeito citopático
AUC	área abaixo da curva	CR	resposta completa
BCC	carcinoma celular basal	13cRA	13- <i>cis</i> -ácido retinóico
BCG	Bacillus Calmette-Guérin (<i>mycobacterium</i>)	Crkl	semelhante a Crk (<i>também</i> CrkL)
Bcl-2	gene do linfoma de célula B-2	CS	síndrome da cocaína
BCNS	síndrome do nevus da célula basal	CSF-1	fator estimulador de colônias 1
BCR	região de quebra de grupamento	Csk	cinase Src C-terminal
BER	reparo de DNA por excisão de base	CT	(1) câncer-testis (antígeno); (2) tomografia computadorizada (raio X); (3) quimioterapia
β-gal	β-galactosidase	CTGF	fator de crescimento do tecido conjuntivo
β ₂ m	β ₂ -microglobulina	CTL	linfócito T citotóxico
BFB	quebra-fusão-ponte (ciclo dos cromossomos)	CTLA-4	antígeno 4 associado a linfócito T citotóxico
BH	homólogo a Bcl-2 (domínio)	CTVS	sarcoma venéreo transmissível canino
BHK	rim de filhote de hamster (células)	CUP	câncer de origem desconhecida (metastático)
bHLH	hélice-alça-hélice básica (fator de transcrição)	CXCL	ligante do receptor de quimocina
BL	linfoma de Burkitt	CXCR	receptor de quimocina
BMI	índice de massa corporal	Cyp	enzima citocromo P-450; <i>também</i> CYP
BMP	proteína morfogenética óssea	d5'-mC	deoxi-5'-metilcitosina
BMPRI	receptor 1 de BMP	D/D	domínio de dimerização
BMSC	célula-tronco de medula óssea	dA	deoxiadenosina
BMT	transplante de medula óssea	DAG	diacilglicerol
BP	benzo(a)pireno	DAPI	4',6'-diamidino-2-fenilindol
bp	par de base	DC	(1) célula dendrítica; (2) disqueratose congênita
BPDE	benzo(a)pirenodiolepóxido	DCIS	carcinoma ductal <i>in situ</i> (da mama)
BPV	papilomavírus bovino	DFS	sobrevivência livre de doença
BrdU	bromodeoxiuridina	dG	deoxiguanosina
BTK	TK de Bruton	Diablo	proteína de baixo pI que liga IAP diretamente
C	(1) carboxi (terminal de proteína); (2) região constante (de uma molécula de anticorpo); (3) citidina; (4) citosina	DISC	complexo de sinalização indutor de morte
C'	C (carboxi) terminal; C-terminal (adj.)	DLBCL	grandes linfomas de células B difusos
CA	ativo constitutivamente	DM	cromossomo de minuto duplo

DMBA	dimetilbenz(a)antraceno	GDNF	fator de crescimento neurotrófico derivado de célula da glia
DN	dominante-negativo (alelo)	GDP	difosfato de guanosina
DP	fator de transcrição protéico relacionado à diferenciação	GEF	fator de troca do nucleotídeo guanina
DPC4	deletado no câncer pancreático-4	GF	fator de crescimento
dR	deoxirribose	GFP	proteína verde fluorescente
ds	dupla-fita (DNA ou RNA)	GGR	reparo genômico global
dTg	deoxitimidina glicol	GH	hormônio de crescimento
DUB	enzima desubiquitinadora	GIST	tumor do estroma gastrointestinal
dUTP	trifosfato de deoxiuridina	GM-CSF	fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos
4E-BP	proteína ligadora a eIF4E	gP	glicoproteína
E2F	gene E2 de adenovírus ativado por fator de transcrição	GPCR	receptor acoplado a proteína G
EBV	vírus Epstein-Barr	GRP	peptídeo liberador de gastrina
EC	carcinoma embrionário (célula)	GSK-3 β	glicogênio sintase cinase-3 β
ECM	matriz extracelular	GSTP1	glutathione S-transferase π
EFC-XV	fragmento, semelhante a endostatina, do colágeno tipo XV	GTP	trifosfato de guanosina
EFS	sobrevivência livre de evento	GTPase	enzima que cliva GTP, normalmente gerando GDP
EGF	fator de crescimento epidermal	GvH	enxerto contra hospedeiro (reação imunológica)
EGF-R	receptor de EGF	GvT	enxerto contra tumor (reação imunológica)
eIF	fator de iniciação (tradução) eucariótico	Gy	<i>gray</i> (unidade de dose de radiação)
eIF4E	fator de iniciação 4E (tradução) eucariótico	^3H	trítio
EM	micrografia eletrônica (ou microscopia eletrônica)	h	prefixo que se refere à forma humana de um gene ou proteína
EMSA	ensaio de mudança de mobilidade eletroforética	H&E	hematoxilina-eosina (corante de tecido)
EMT	transição epitelial-mesenquimal	HAMA	anticorpo humano anticamundongo
ENU	<i>N</i> -etilnitrosouréia	HB-EGF	EGF que se liga a heparina
env	glicoproteína de envelope de retrovírus	HBV	vírus da hepatite B
EPC	célula precursora endotelial; célula progenitora endotelial	HCA	amina heterocíclica
EpCAM	molécula de adesão da célula epitelial	HCC	carcinoma hepatocelular
EPO	eritropoietina	hCG	gonadotrofina coriônica humana
ER	receptor de estrogênio	HCL	leucemia das células pilosas
ERK	cinase extracelular regulada por sinal	HCMV	citomegalovírus humano
ERV	retrovírus endógeno	HCV	vírus da hepatite C
ES	células-tronco embrionárias	HDAC	histona deacetilase
ESA	antígeno de superfície do epitélio	HDM2	homólogo humano de MDM2
ET-1	endotelina 1	HDR	reparo direcionado pela homologia
FA	anemia de Fanconi (síndrome)	HEK	rim embrionário humano (células)
FACS	separador celular ativado por fluorescência (citômetro de fluxo)	HERV	retrovírus endógeno humano
FADD	domínio de morte associado a Fas (proteína)	HGF	fator de crescimento de hepatócito; <i>também chamado de fator de motilidade (SF)</i>
FAK	cinase de adesão focal	HGPRT	hipoxantina guanina fosforribosiltransferase
FAP	(1) polipose adenomatosa familiar; (2) proteína ativadora de fibroblasto	Hh	Hedgehog
FasL	ligante do receptor de morte Fas	HHV-8	herpesvírus humano tipo 8; <i>também chamado de herpesvírus do sarcoma de Kaposi (KSHV)</i>
Fc	região constante de uma molécula de anticorpo IgG	HIF	fator induzido por hipoxia (transcrição)
FDA	U.S. Food and Drug Administration	HIP1	proteína 1 que interage com huntingtin
FDG	2-fluoro-2-deoxi-D-glicose	HIV	vírus da imunodeficiência humana
FGF	fator de crescimento de fibroblasto	HLA	antígeno do leucócito humano (<i>equivalente a MHC</i>)
FISH	hibridização <i>in situ</i> por fluorescência	HMEC	célula epitelial mamária humana
FITC	isotiocianato de fluoresceína (corante)	HNPCC	câncer hereditário de cólon sem polipose
FKBP12	proteína de 12 kD ligadora a FK506	hnRNA	RNA nuclear heterogêneo
FL	(1) linfoma folicular (célula B); ligante do receptor Flt-3	HNSCC	carcinoma de célula escamosa de cabeça e pescoço
FLICE	enzima, semelhante a FADD, convertora de interleucina-1 β	HPE	epitélio de próstata humano (célula)
FLIP	proteína inibidora de FLICE	HPRT	hipoxantina fosforribosiltransferase
Flt	tirosina cinase semelhante a Fms	HPV	papilomavírus humano
FLV	vírus da leucemia murina de Friend	HSA	albumina sérica humana
FPT	proteína farnesil transferase	HSC	célula-tronco hematopoiética
FRB	ligante de FKBP12 + rapamicina (domínio de mTOR)	HSIL	lesão intra-epitelial escamosa de alto grau
Frz	Frizzled	HSR	região homogeneamente corada
FSH	hormônio folículo-estimulante	HSV-1	vírus herpes simplex tipo 1
FTI	inibidor de farnesiltransferase	HTLV-I	vírus linfotrópico da célula T humano tipo I (ou vírus da leucemia humana de células T)
5-FU	5-fluorouracil	HTS	triagem em larga escala
G	(1) guanina; (2) nucleotídeo guanina; (3) guanosina	HU	hidroxiuréia
G ₁	fase de intervalo 1 (do inglês <i>gap</i>) (do ciclo celular)	IAP	inibidor de apoptose
G ₂	fase de intervalo 2 (do inglês <i>gap</i>) (do ciclo celular)	IC ₅₀	concentração necessária para obter 50% de inibição
G6PD	glicose-6-fosfato desidrogenase	ICAD	inibidor de DNase ativada por caspase
GAG	glicosaminoglicano	IEG	gene imediato
gag	antígeno específico de grupo (proteína do capsídeo de retrovírus)	IEL	linfócito intra-epitelial
GAK	cinase associada à ciclina G	IFN	interferon
GAP	proteína ativadora de GTPase	IFN-R	receptor de interferon
GAPDH	gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase	IGF-1	fator 1 de crescimento semelhante a insulina
GBM	glioblastoma multiforme		
GCB	linfoma de célula B do centro germinativo		

IGF-1R	receptor de IGF-1	MT	antígeno “middle T” médio de poliomavírus
IGFBP	proteína que se liga ao fator 1 de crescimento semelhante a insulina	mt	tipo mutante
IκB	inibidor de NF-κB	MT1-MMP	MMP de membrana
IKK	IκB cinase	MTD	dose tolerada máxima
IL	interleucina	MTH1	homólogo 1 de <i>mutT</i>
ILK	cinase ligada a integrina	mTOR	alvo mamífero de rapamicina
IP ₃	trifosfato de inositol (1,4,5)	μM	micromolar (10 ⁻⁶ molar)
IR	receptor de insulina	MUP	proteína urinária maior
IRK	receptor de insulina cinase	N'	N (amino) terminal
Jak	Janus cinase	NAT	N-acetiltransferase
JCV	vírus JC, um parente próximo do SV40	NBCCS	síndrome do carcinoma da célula basal nervóide
JM	justamembrana	NBS	síndrome da quebra de Nijmegen
kb	quilobase	NER	reparo de DNA por excisão de nucleotídeo
kbp	par de quilobase	NES	sinal de exportação nuclear
kD	quilodalton	Nf/NF	neurofibromatose
KGF	fator de crescimento de queratinócito	NF-κB	fator nuclear κB
KIR	receptor inibidor de <i>killer</i> (matadora)	NGF	fator de crescimento de nervo
KO	nocaute; (gene) nocauteado	NHEJ	junção final não-homóloga
KSHV	ver HHV-8	NHL	linfoma do tipo não-Hodgkin
LAK	(célula) <i>killer</i> ativada por linfocina	NHPF	fibroblasto prostático humano normal
LCM	microdissecação por captura a <i>laser</i>	NK	matador natural (linfócito)
LDL	lipoproteína de baixa densidade	NKT	matador natural que expressa receptor de célula T
LEF	fator ativador de linfóide	NLS	seqüência de localização nuclear
LH	hormônio luteinizante	nM	nanomolar (10 ⁻⁹ molar)
LIF	fator inibidor de leucemia	NMR	ressonância magnética nuclear
LLC	carcinoma de pulmão de Lewis	NOD	diabético não-obeso
LOH	perda de heterozigossidade	NOD/SCID	diabético não-obeso/imunodeficiência combinada severa
LRC	célula retentora de marcação	NotchL	ligante Notch
LT	antígeno large T grande (de SV40 ou poliomavírus)	NRG	neurogulina
LTR	repetição terminal longa (de um pró-vírus)	NSAID	droga antiinflamatória não-esteroidal
M	mitose	NSCLC	carcinoma pulmonar de célula não-pequena
m	prefixo referente à forma murina de um gene ou proteína	NTD	domínio N-terminal
M-CSF	fator estimulante de colônia de macrófago	OD	densidade óptica
MAC	complexo de ataque de membrana	OHT	4-hidroxi tamoxifeno
MALT	tecido linfóide associado à mucosa	OPG	ligante osteoprotegerino
MAPK	proteína cinase ativada por mitógeno; <i>também</i> MAP-cinase	OPN	osteopontina
MAPKK	cinase que fosforila a MAPK	OSE	epitélio de superfície ovariana
MAPKKK	cinase que fosforila a MAPKK	8-oxo-dG	8-oxo-deoxiguanosina
3-MC	3-metilcolantreno	p	(1) braço curto de um cromossomo; (2) probabilidade de um evento
MCP-1	proteína 1 quimiotática de monócito	PAH	hidrocarboneto aromático policíclico
mCRP	proteína reguladora de complemento ligada à membrana	PAI-1	inibidor 1 do ativador de plasminogênio
MDCK	(células) rim canino Maden-Darby	PanIN	neoplasia intra-epitelial pancreática
MDM2	cromossomo 2 de duplo minuto de camundongo	PARP	Poli (ADP ribose) polimerase
MDR	(fenótipo) resistente a múltiplas drogas	PBS	salina tamponada por fosfato
MDS	síndrome mielodisplástica	PCNA	antígeno nuclear de célula proliferativa
MEC	célula epitelial mamária	PCR	reação em cadeia da polimerase
MEF	fibroblasto embrionário de camundongo	PD	(1) farmacodinâmica; (2) dobragem de população
MeIQx	2-amino-3,8-dimetilimidazol[4,5-f]-quinoxalina	PDGF	fator de crescimento derivado de plaqueta
MEK	MAP/Erk cinase	PDGF-R	receptor de PDGF
MEN	neoplasia endócrina múltipla	PDK1	cinase 1 dependente de fosfoinositídeo
MET	transição epitelial-mesenquimal	PEG	polietileno glicol
MGMT	O ⁶ -metilguanina DNA metiltransferase	PET	tomografia por emissão de pósitron
MHC	complexo maior de histocompatibilidade (<i>ver também</i> HLA)	PFS	sobrevivência livre de progressão
MIN	instabilidade de microssatélite	PGE ₂	prostaglandina E ₂
MKP	MAP cinase fosfatase	PH	homologia à plestrina (ligação de PIP ₃) (domínio)
MLV	vírus da leucemia murina	PhIP	2-amino-1-metil-6-fenilimidazo[4,5-b] piridina
mM	milimolar (10 ⁻³ molar)	PhK	fosforilase cinase
MM	mieloma múltiplo	PI	(1) fosfatidilinositol; (2) iodeto de propídeo
MMP	metaloproteinase de matriz	PI(3,4,5)P ₃	equivalente a PIP ₃
MMR	reparo de pareamento incorreto	PI3K	fosfatidilinositol 3 cinase
mms	metilmetano sulfonato	PIN	neoplasia intra-epitelial prostática
MMTV	vírus de tumor mamário de camundongo	PINCH	nova proteína rica em histidina e cisteína particularmente interessante
MNNG	N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidina	PIP ₂	fosfatidilinositol (4,5) difosfato
MNU	N-metilnitrosouréia	PIP ₃	fosfatidilinositol (3,4,5) trifosfato
MoAb	anticorpo monoclonal	PK	farmacocinética
moca	4,4'-metilenobis(2-cloroanilina)	PKA	proteína cinase A
MPNST	tumor maligno da bainha do nervo periférico	PKB	proteína cinase B
MRI	imagem de ressonância magnética	PKC	proteína cinase C
mRNA	RNA mensageiro	PLC	fosfolipase C
MSP	reação em cadeia da polimerase específica para metilação		

PLD	fosfolipase D	Sos	<i>son of sevenless</i>
PMA	forbol-12-meristato-13-acetato (=TPA)	Srf	fator de resposta sérica
PMBL	linfoma primário de célula B mediastinal	ss	(DNA ou RNA) fita simples
PML	(1) leucemia promielocítica; (2) leucoencefalopatia multifocal progressiva	STAT	transdutor de sinal e ativador de transcrição
PMN	leucócitos/neutrófilos polimorfonucleares	Str-1	estromelislina-1
PND	degeneração neurológica paraneoplásica	STS	estaurosporina
pol	(1) polimerase; (2) transcriptase reversa de retrovírus	SUMO	modificador pequeno semelhante à ubiquitina
pol II	RNA polimerase II	SV	vírus simiano
6-4 PP	fotoproducto pirimidina (6,4) pirimidinona	T	(1) timina; (2) timidina
PP1	proteína fosfatase 1	t	referente a uma translocação cromossomal
PP2A	proteína fosfatase 2 ^a	T _{1/2}	meia-vida
PR	resposta parcial	T _C	célula T citotóxica
pRb	proteína de retinoblastoma	T _H	célula T auxiliar
PRL	prolactina	T _m	temperatura de fusão
Pro-B ALL	leucemia linfocítica aguda de pro-célula B	T _{reg}	célula T regulatória
PS	fosfatidilserina	TAA	antígeno associado a tumor
PSA	antígeno específico de próstata	T-ALL	leucemia linfocítica aguda de célula T
PTB	(domínio) ligação à fosfotirosina	TAM	macrófago associado a tumor
PTC	(1) carcinoma de tireóide papilar; (2) Patched	TAP1/2	transportador associado a processamento de antígeno
PTEN	homólogo a fosfatase e tensina deletado no cromossomo 10	TATA	antígeno de transplante associado a tumor
PTH	hormônio paratireoide	TCF	fator de célula T
PTHrP	peptídeo relacionado ao hormônio paratireoide	TCR	(1) receptor de célula T; (2) reparo de DNA acoplado à transcrição
PTP	fosfotirosina fosfatase	TdT	desoxinucleotidil terminal transferase
PyMT	proteína midde T média de poliomavírus	TEL/AML1	translocação cromossômica
q	braço curto de um cromossomo	TEM	microscopia eletrônica de transmissão
qPCR	reação quantitativa em cadeia da polimerase	TERT	telomerase transcriptase reversa
R	ponto de restrição	TF	fator de transcrição
RA	ácido retinóico	TGF	fator de crescimento transformante
RAG	gene ativador de recombinação	TGF- α	fator de crescimento transformante α
RANK	ativador do receptor de NF- κ B	TGF- β	fator de crescimento transformante β
RANKL	(receptor) ligante de RANK	TGF- β R	receptor de TGF- β
RAR	receptor de ácido retinóico	Thr	treonina
Rb	proteína de retinoblastoma	TIAM-1	gene 1 de metástase e invasão de linfoma de célula T
REF	fibroblasto de embrião de rato	TIL	linfócito infiltrador de tumor
RFLP	polimorfismo de tamanho de fragmento de restrição	TIMP	inibidor de tecido de metaloproteinase
Rheb	homólogo a Ras enriquecido no cérebro	TK	tirosina cinase
ROS	espécie reativa de oxigênio	TM	(domínio de uma proteína) transmembrana
RPA	proteína A de replicação	TNF	fator de necrose de tumor
RR	risco relativo	TOR	alvo de rapamicina
RSV	vírus do sarcoma de Rous	TPA	12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (= PMA)
RT	transcriptase reversa	TPO	trombopoietina
RTK	receptor de tirosina cinase	TRAIL	ligante indutor de apoptose relacionado a TNF
S	(1) fase de síntese de DNA (do ciclo celular); (2) svedberg (unidade de sedimentação em centrifugação)	TRAP	protocolo de amplificação de repetição telomérica
S1P	esfingosino-1-fosfato	TRF	fragmento de restrição telomérica
S6	proteína 6 da subunidade ribossomal menor	tRNA	RNA transportador
S6K1	p70 S6 cinase 1	TrpRS	triptofanil-tRNA sintetase
SA- β -gal	β -galactosidase associada à senescência	ts	sensitivo à temperatura
SAHF	focos heterocromáticos associados à senescência	TSA	(1) tricostatina A; (2) antígeno específico de tumor
SCE	troca de cromátide irmã	TSC	esclerose tuberosa
SCF	fator de célula-tronco	TSG	gene supressor de tumor
SCID	(síndrome) imunodeficiência combinada severa	TSHR	receptor de hormônio estimulador de tireóide
SCLC	carcinoma pulmonar de célula pequena	Tsp-1	trombospondina-1
SDF-1	fator 1 derivado de estroma	TSTA	antígeno de transplante específico de tumor
SEM	micrográfo/microscópio/microscopia eletrônica de varredura	TUNEL	marcação da extremidade de quebra de dUTP mediada por TdT
Ser	serina	U	(1) uracil; (2) uridina
SF	fator de espalhamento; <i>ver</i> HGF	UC	colite ulcerativa
SH1	domínio de homologia 1 a Src (tirosina cinase)	uPA	ativador de plasminogênio tipo urocinase
SH2	domínio de homologia 2 a Src (ligação de fosfotirosina)	uPAR	receptor de uPA
SH3	domínio de homologia 3 a Src (ligação da porção rica em prolina)	UV	ultravioleta
SHP	fosfatase contendo SH2	UV-B	radiação ultravioleta B
SIP1	proteína 1 de interação com Smad	V	região variável (de uma molécula de anticorpo)
SKY	cariotipagem espectral multicolor	VEGF	fator de crescimento de endotélio vascular (= VPF)
Sky1	cinase específica de proteína SR de levedura em brotamento	VHL	von Hippel-Lindau
SLE	lúpus eritematoso sistêmico	VPF	fator de permeabilidade vascular (= VEGF)
SMA	actina de músculo liso	VSMC	célula muscular lisa vascular
Smac	segundo ativador de caspase derivado de mitocôndria	WM	macroglobulinemia de Waldenström
Smo	Smoothened	wt	tipo selvagem
SNP	polimorfismo de nucleotídeo único	XAF1	fator 1 associado a XIAP
SOD	superóxido desmutase	XIAP	inibidor de apoptose ligado ao cromossomo X
		XP	xeroderma pigmentoso

Glossário

abásico – Refere-se a um nucleotídeo que tenha perdido sua base purínica ou pirimidínica. *Ver também* **apurínico**; **apirimidínico**.

ablação – Eliminação.

abcissa – Eixo horizontal ou X de um gráfico cartesiano.

abluminal – Localizado fora do lúmen de um ducto ou outras estruturas ocas.

abscisão – Etapa final da citocinese, quando as ligações que faltam, incluindo aquelas criadas por microtúbulos, são separadas, permitindo a completa separação de duas células-filhas.

acelular – Desprovido de células.

acetilação – Ligação covalente de um grupo acetila a uma segunda molécula, como, por exemplo, uma proteína.

acentuador – Uma sequência relativamente pequena de nucleotídeos próximos ou dentro de um gene na qual um fator de transcrição pode se ligar, e assim, influenciar a transcrição desse gene.

acromegalia – Condição patológica de crescimento excessivo de alguns tecidos, geralmente causada pela elaboração excessiva de hormônio de crescimento por um tumor na pituitária.

adenocarcinoma – Tumor derivado de células epiteliais secretoras.

adenoma (adj., = **adenomatoso**) – Qualquer de uma série de crescimentos pré-malignos e não-invasivos em vários tecidos epiteliais, muitos dos quais têm potencial para progredir até carcinoma. *Ver também* **pólipo**.

adipócitos – Células especializadas de linhagem mesenquimal, proximamente relacionadas a fibroblastos, que criam gordura e a armazenam em grandes glóbulos no citoplasma; é o tipo celular dominante em tecido de gordura.

adipogênico – Causa diferenciação de adipócitos.

adjuntar – Colocar diretamente próximo de alguma coisa.

adjuvante – (1) Uma substância que é um estimulante poderoso da resposta imune enquanto não estiver sendo antígeno para si mesma. (2) Uma substância que é usada em conjunto com uma terapia a fim de aumentar a eficácia desta última.

adrenal – Refere-se às glândulas secretoras situadas acima dos rins.

aducto – Estrutura molecular enovelada que aparece após ligação covalente de um mutagênico com uma ou outra porção da molécula de DNA.

aferente – Referindo-se aos sinais em surgimento.

agonista – Agente ativador; oposto a antagonista.

alelo – Uma alternativa entre diferentes versões de um gene que pode ser definido pelo fenótipo que é criado, pela proteína para qual codifica ou por sua sequência de nucleotídeos.

alelo nulo – Alelo de um gene que elimina todas as funções normais desse gene.

alogênico – (1) Refere-se a dois membros geneticamente distintos da mesma espécie. (2) Descreve a relação entre dois grupos de células ou tecidos derivados de antecedente genético distinto.

alográfico – Implantação de células de um animal de um antecedente genético em um animal hospedeiro de outro antecedente genético, mas de mesma espécie.

alquilante – Capaz de ligar um grupo alquila ou grupo químico de estrutura similar a um substrato, como uma base do DNA.

alvéolo (pl. = **alvéolos**) – Uma pequena cavidade entre um tecido que é conectado a um ducto, assim como a cavidade vista nos pulmões e em glândulas mamárias durante a gravidez.

amplicon – Um trecho definido de DNA cromossomal que é submetido à amplificação.

amplificação – Mecanismo genético com o qual o número de cópias de um gene é aumentado acima do nível normal em genomas diplóides.

amplificação do gene – Aumento do número de cópias de um gene normalmente presente em genoma diplóide.

anfipático – Descreve uma molécula contendo domínios hidrofóbicos e hidrofílicos distintos.

anáfase – Terceira subfase da mitose, na qual as cromátides pareadas são segregadas para os dois lados opostos da célula.

anaplásico – Refere-se a um tumor contendo um tecido e arquitetura celular com características diferenciadas do tecido de origem.

anastomose – Conexão formada entre o final de duas estruturas de um ducto, assim como a conexão formada diretamente entre uma artéria e uma veia.

aneuplóide – (1) Descreve um cariótipo que se diferencia de diplóides devido ao aumento ou decréscimo no número de certos cromossomos. (2) Menos freqüente, descreve um cariótipo que carrega cromossomos estruturalmente anormais.

angiogênese – Processo no qual novos vasos sanguíneos são formados. *Também chamado* **neoangiogênese** em algumas circunstâncias.

angiossarcoma – Tumor das células precursoras das células endoteliais.

anoikis – Forma de apoptose que é despertada pela falência de uma célula em estabelecer ancoragem a um substrato sólido, como a matriz extracelular, ou por perda dessa ancoragem.

anoxia – Estado do ambiente no qual o oxigênio é essencialmente ausente.

anticorpo – Uma proteína solúvel produzida por células do plasma do sistema imune que é capaz de reconhecer e ligar antígenos particulares com alta afinidade. *Ver também* **imunoglobulina**.

anticorpo humanizado – Uma molécula de anticorpo de uma espécie na qual uma região constante (C) e uma região variável (V) de sequência de aminoácidos fora do sítio de combinação do antígeno foram substituídas pela sequência homóloga de origem humana, deixando apenas a sequência da combinação do antígeno não-modificada.

anticorpo monoclonal – Anticorpo formado por uma população celular produzida por meio da imortalização de um único linfócito B produtor de anticorpos, para que todas as moléculas de anti-

corpos em uma preparação sejam idênticas umas às outras e mostrem especificidade idêntica a antígenos.

antígeno – Uma molécula ou porção de uma molécula, freqüentemente um oligopeptídeo, que pode ser especificamente reconhecida e ligada por um anticorpo ou um receptor de célula T ou, ainda, provocar a produção de um anticorpo.

antígeno de histocompatibilidade – Proteína de superfície celular que determina se uma célula ou tecido enxertado será ou não tolerado pelo sistema imune de um organismo hospedeiro. *Ver também* **antígeno de histocompatibilidade maior**.

antígeno de histocompatibilidade maior – Um grupo de proteínas da superfície celular que é responsável pela apresentação de antígenos de oligopeptídeos que respondem a células do sistema imune. *Ver também* **antígeno de histocompatibilidade**.

anti-soro – Soro que é produzido por um animal exposto a um antígeno específico e é capaz de reconhecer e ligar aquele antígeno.

alto grau – Refere-se a um tumor que progrediu através de muitas etapas da tumorigênese de múltiplas etapas e se tornou altamente maligno.

apatita – Componente mineral dos ossos composto de cristais de fosfato de cálcio.

apirimidínico – Refere-se ao produto de depirimidinização, no qual a ligação glicosídica que une uma desoxirribose ou ribose a uma base pirimídica é quebrada, deixando apenas a desoxirribose ou ribose no DNA ou RNA, respectivamente.

apoptose – Programa complexo de autodestruição celular, ativado por uma variedade de estímulos e envolvendo a ativação de enzimas caspases, que resultam na rápida fragmentação e fagocitose de uma célula.

apoptossomo – Complexo multiprotéico que consiste em moléculas do citocromo *c* e Apaf-1 e ajuda a iniciar a apoptose pela ativação da procaspase 9 em caspase 9.

apurínico – Refere-se ao produto de depurinação, no qual a ligação glicosídica que une uma desoxirribose ou ribose a uma base purínica é quebrada, deixando apenas a desoxirribose ou ribose no DNA ou RNA, respectivamente.

aromático – Refere-se a uma molécula orgânica que contém um ou mais anéis benzênicos.

arteríola – Uma pequena artéria que evacua nos capilares.

ascitos – O fluido que se acumula na cavidade peritoneal em alguns pacientes com câncer, freqüentemente contendo células malignas.

assinatura de expressão – Uma constelação de genes ativados e reprimidos que podem estar correlacionados com um fenótipo biológico definido.

assíncrono – Refere-se a uma população de células que são dispersas através do ciclo celular durante algum período e então não executam etapas específicas do ciclo celular de maneira sincronizada e coordenada.

astrocitoma – Um tumor dos astrócitos, um tipo de células não-neuronais de suporte no cérebro.

ataxia – Perda de coordenação muscular, frequentemente causada pela disfunção cerebelar.

atenuado – (De um agente infeccioso, como um vírus) criando dano mínimo em uma célula hospedeira ou organismo. *Veja também virulento.*

atrofia – Redução de um tecido, frequentemente causada pela perda da viabilidade dos seus componentes celulares ou devido a diminuição do número de células normais.

autócrina – Refere-se à rota de sinalização de um hormônio ou fator que é liberado por uma célula e prossegue para agir sobre a mesma célula (ou mesmo tipo celular) que o liberou.

autocruzamento – Cruzamento de uma linhagem de organismos tal como uma linhagem de camundongos ou ratos entre si, para atingir identidade genética entre todos os indivíduos da linhagem (com exceção das diferenças genéticas entre macho e fêmea).

auto-imune – Refere-se a um processo ou doença no qual o sistema imune ataca células e tecidos do próprio organismo.

autóctone – (1) De origem nativa. (2) Refere-se a um tumor que emerge em um organismo (particularmente de células implantadas ou de fragmentos de tumor).

autofagia – Programa de resposta celular à falta de nutrientes envolvendo a digestão de organelas das células dentro de seus próprios lisossomos.

autofosforilação – Fosforilação de uma molécula de proteína por sua própria atividade cinase associada.

autólogo – Refere-se a material biológico, geralmente células ou tecidos, que se originou no corpo do próprio paciente (e podem ser reintroduzido no paciente por meio de manipulação *ex vivo*).

auto-radiografia – Procedimento de detecção de moléculas radioláveis colocando-as (ou as amostras que as carregam) adjacentes a emulsão radiográfica, a qual responde ao decaimento radiativo pela produção de grânulos de prata.

auto-reactivo – Referindo-se à habilidade de certos componentes do sistema imune de um organismo de reconhecer e reagir com o tecido normal e antígenos celulares normais daquele organismo.

autossomo – Um cromossomo que não é um cromossomo sexual, isto é, nem cromossomo X, nem Y.

axilar – Refere-se à axila.

bagagem genética – Ordem inteira de alelos carregados em um genoma, com a exceção de um pequeno número de genes, que são o objetivo do estudo.

baixo grau – Referindo-se a um tumor que progrediu minimamente e continua relativamente benigno.

basal – (1) Refere-se a uma localização física mais baixa. (2) Refere-se a uma (baixa) taxa de atividade ou função observada na ausência de qualquer estímulo de ativação.

benigno – (1) Descreve um tumor que é confinado a um sítio específico em um tecido e não há evidências de invasão a tecidos adjacentes. (2) Refere-se a um tumor de epitélio que não penetrou através da membrana basal.

biblioteca – (1) Referindo-se à coleção de clones de genes derivados do genoma de um organismo, no qual cada componente do clone realmente deriva de um elemento distinto nesse genoma. (2) Referindo-se a outras coleções de clone de DNA, especialmente clones de cDNA, cada qual produzido a partir da transcrição reversa de um mRNA distinto expresso por um certo tipo celular.

biespecífico – Capaz de reconhecer especificamente dois objetos simultaneamente.

bioinformática – A ciência que utiliza métodos computacionais para analisar informações biológicas, especialmente conjuntos de dados biológicos complexos.

bisfosfonatos – Uma classe de drogas, caracterizada por uma “espinha dorsal” cuja estrutura é P-C-P, que é incorporada dentro da apatita do osso e subsequentemente se torna disponível para “envenenar” osteoclastos que poderiam futuramente dissolver os ossos.

BLAST – Termo frequentemente usado como prefixo ou sufixo, indicando uma relativa não-diferenciação ou célula precursora de embriogênese.

blastocle – Cavidade interna de um blastocisto.

blastocisto – Estágio mais recente da embriogênese de vertebrados, no qual o embrião consiste em uma camada mais externa de células cercado por uma cavidade interna.

vesícula – Uma pequena herniação semelhante a uma bolha em uma membrana, como, por exemplo, a membrana plasmática.

bronquial – Refere-se à principal via aérea dos pulmões.

bucal – Refere-se aos tecidos da cavidade oral, especificamente o revestimento epitelial da bochecha.

cancerização de campo – Processo no qual uma região de um órgão produz, ostensiva e independentemente, múltiplos crescimentos ou neoplasmas pré-malignos.

capsídeo – Recobrimento de proteína de uma partícula viral que forma envelope e protege o genoma viral.

caquexia – Estado fisiológico, com frequência visto tardiamente no desenvolvimento do câncer, no qual o paciente perde apetite e sofre perda de tecido ao redor do corpo.

carcinógeno – Um agente que contribui para a formação de um tumor.

carcinógeno final – Composto químico que é capaz de contribuir diretamente para indução do câncer sem modificação química prévia ou posterior, normalmente por interação química direta com o DNA, alterando assim a estrutura final.

carcinógeno completo – Um agente que pode atuar como iniciador e promotor da progressão tumoral.

carcinogênico – Capaz de causar ou contribuir para a causa do câncer.

carcinoma (adj., = **carcinomatoso**) – Um câncer que emerge de células epiteliais.

carcinoma de pulmão de células não-pequenas – Alguns dos inúmeros tipos de câncer de pulmão, com a exceção de carcinoma de pulmão de células pequenas.

carcinoma hepatocelular – *Ver hepatoma.*

carcinoma pulmonar de célula pequena – Câncer de pulmão de células especializadas que possuem propriedade neurosecretora.

caretaker – Um gene que codifica uma proteína responsável por manter a integridade do genoma e então prevenir o aparecimento de células neoplásicas.

cariótipo – Arranjo de cromossomos carregados por uma célula, como determinado por análise detalhada desses cromossomos, frequentemente realizada com cromossomos condensados durante a metáfase. (2) Imagem dos cromossomos na metáfase de uma célula sistematicamente arranjados por pares homólogos a partir do maior par ou menor par.

caspase – Uma protease cisteína-aspartila específica.

CD4 – Uma proteína celular de superfície mostrada por células T auxiliares que permite o reconhecimento de proteínas MHC de classe II na superfície de células apresentadoras de antígenos profissionais.

CD8 – Uma proteína celular de superfície mostrada por células T citotóxicas que permite o reconhecimento de proteínas MHC de classe I na superfície de células que elas almejam para destruição.

CD20 – Um antígeno que é mostrado na superfície de muitos tipos celulares da linhagem celular B.

células apresentadoras de antígeno – Uma classe de células – frequentemente chamada de células apresentadoras de antígenos profissionais, incluindo células dendríticas, macrófagos, e células B – que apresenta antígenos de oligopeptídeos via moléculas de MHC de classe II para outros linfócitos, notavelmente células T auxiliares e células T citotóxicas.

célula autônoma – Refere-se a um fenótipo ou comportamento de uma célula que é governado por seu próprio genoma e fisiologia interna e não por suas interações com outras células.

célula amplificadora transitória – Células relativamente não-diferenciadas que são inicialmente geradas pela divisão de uma célula-tronco e são capazes de proliferar exponencialmente por um número limitado de gerações celulares antes de espalhar uma progênie muito diferenciada, que em muitos tecidos são pós-mitóticas.

célula plasmática – Células da linhagem de células B que secretam anticorpos no plasma sanguíneo.

célula dendrítica – Uma célula imune que fagocita fragmentos da célula ou agentes infecciosos e após apresenta oligopeptídeos derivados dessas partículas fagocitadas para vários tipos de células T auxiliares nos nódulos linfáticos.

células endoteliais – (1) Células mesenquimais que formam a parede dos capilares ou ductos linfáticos assumindo um formato de tubo. (2) Células mesenquimais revestindo internamente paredes do lúmen de grandes vasos sanguíneos ou ductos linfáticos.

células primárias – (1) Literalmente células que foram recentemente retiradas de tecido vivo para placas de cultura e que não se propagaram na cultura. (2) Mais comumente, células que foram exportadas de tecido vivo para placas de cultura e, logo após, foram submetidas a somente um pequeno número de sucessivas passagens *in vitro*.

célula apresentadora de antígeno profissional – *Ver células apresentadoras de antígeno.*

célula progenitora – *Ver célula amplificadora transitória.*

célula-tronco – Tipo celular de um tecido capaz de se renovar e também capaz de gerar células-filhas que desenvolvem novos fenótipos, incluindo aqueles mais diferenciados do que o fenótipo da célula-tronco.

cep – Plano de aprimoramento de zona, esquema numérico determinado pelo serviço postal dos Estados Unidos que designa cada área de entrega com seu próprio número de 5 dígitos; por analogia, o endereço residencial hipotético em que as células cancerosas que estão sendo disseminadas buscam superfície luminosa de capilares em tecidos específicos.

centríolo – Componente do centróssomo do qual o feixe de fibras irradia durante a mitose e a meiose.

centrômero – Região de um cromossomo que segura as duas cromátides juntas e as liga, via um cinetocoro, com feixes de fibras mitóticas ou meióticas.

centrossomo – Um corpo no citoplasma contendo um centríolo e proteínas subordinadas que funcio-

- nam para organizar uma metade dos feixes mitóticos.
- ciclina** – Uma proteína que se associa a uma cinase ciclina-dependente e serve como uma subunidade regulatória dessa cinase ativando essa atividade catalítica e direcionando-a ao substrato apropriado.
- ciclo celular** – A sequência de mudanças em uma célula desde o momento em que é criada por divisão celular, continuando por um período em que seu conteúdo, incluindo o DNA cromossomal, é duplicado, terminando com a divisão celular subsequente e a formação das células-filhas.
- cicloeximida** – Uma droga capaz de prevenir o movimento de ribossomos ao longo do mRNA molde, bloqueando assim a síntese proteica.
- ciclo lítico** – Ciclo de uma infecção viral e replicação que resulta finalmente na morte da célula hospedeira infectada.
- ciclopia** – Malformação da cabeça que ocorre em embriões com apenas um olho simples e central.
- cinase** – Enzima que liga covalentemente grupos fosfato a moléculas substrato, frequentemente proteínas.
- cinase dependente de ciclina** – Tipo de serina/treonina cinase utilizada pela maquinaria do ciclo celular que depende de uma proteína ciclina associada para funcionar de maneira adequada.
- cinetocoro** – Complexo de proteínas nucleares que está associado ao DNA centromérico de um cromossomo e é responsável, durante a mitose (ou meiose), pela formação de uma conexão física entre o cromossomo e o microtúbulo e as fibras do fuso.
- cinoma** – O repertório completo de cinases que são codificadas por um genoma, assim como o genoma humano.
- cite** – Sufixo indicando um tipo de célula.
- citoarquitetura** – Estrutura física de uma célula.
- citocida** – Refere-se a um efeito ou influência que causa a morte celular.
- citocinese** – Último passo da fase M, frequentemente considerada parte da telófase, durante a qual o citoplasma divide-se e separa-se nas células-filhas.
- citoesqueleto** – Emaranhado de proteínas nas células, principalmente no citoplasma, que confere estrutura e rigidez a este, além de capacitá-lo a exercer mobilidade.
- citologia** (adj., = **citológico**) – (1) Análise microscópica da estrutura subcelular. (2) Aparência microscópica de uma célula.
- citopática** – Causa danos ou morte para uma célula.
- citoqueratina** – Forma do filamento intermediário da proteína queratina que constitui parte do citoesqueleto de uma célula epitelial; termo usado para distinguir estes de queratinas que constituem o cabelo, unhas e penas.
- citocinas** – (1) Fator de crescimento que estimula um ou muitos tipos celulares que constituem o sistema hematopoiético. (2) Fatores regulatórios do sistema imune, incluindo interferons e interleucinas, que, assim como fatores de crescimento mitogênicos, conduzem sinal entre as células.
- citossol** – Porção do citoplasma que contém material solúvel que não está amarrado com o citoesqueleto e nem mesmo com as membranas.
- citostático** – Refere-se a uma influência ou força que inibe a proliferação de células sem que haja, necessariamente, algum efeito na viabilidade das células.
- clone** (adj., = **clonal**) – (1) Cópia de um gene que foi isolado por procedimento de recombinação de DNA e amplificado a um grande número de cópias idênticas. (2) População de células, todas descendentes de uma célula progenitora comum. (3) Descendência de um procedimento de reprodução assexuada na qual o genoma de uma célula somática de um organismo é usado para formar uma célula que funciona de maneira equivalente à de um ovo fertilizado que pode mais tarde desenvolver-se por si só em outro organismo.
- clone genômico** – O produto de um procedimento que gera inúmeras cópias de um segmento específico do genoma de um organismo (p. ex., seu DNA cromossomal) por meio de isolamento e amplificação.
- co-carcinógeno** – Um agente ou substância que, enquanto não-carcinogênico por si só, colabora com outro agente para permitir que a carcinogênese progrida.
- códon de sentido trocado** – Códon triplo no código genético que especifica um resíduo de aminoácido diferente daquele especificado pelo códon que substitui.
- códon sem sentido** – Um códon triplo no código genético que especifica a terminação de uma cadeia de aminoácido crescente.
- colônia** – (1) Um agrupamento de células, geralmente de origem clonal. (2) Um agrupamento de células que é capaz de proliferar na ausência de ancoragem a substrato sólido.
- colonização** – Proliferação de células entre uma micrometástase que leva à formação de uma metástase macroscópica.
- colorretal** – Refere-se ao trato gastrointestinal inferior, incluindo o cólon e o reto.
- compartimento** – Espaço físico ou virtual que contém todas as células de um dado tipo dentro de um tecido – por exemplo, compartimento de células-tronco.
- complementação** – Habilidade de dois genótipos mutantes, quando coexistentes na mesma célula ou organismo, de compensar os defeitos um do outro e então criar um fenótipo tipo selvagem, indicando que os dois genótipos carregam mudanças em genes distintos.
- complemento** – Um grupo de proteínas plasmáticas colaboradoras que podem se associar a moléculas de anticorpo que estão ligadas a antígenos presentes na superfície das células, incluindo aquelas mostradas por bactérias, levedura ou células mamárias; uma vez ligadas por meio desses anticorpos a uma célula de superfície, o complemento pode matar a célula introduzindo poros nas proximidades da membrana plasmática.
- confluência** – Estado atingido quando células em camada de cultura proliferam até preencherem todo espaço disponível no topo da superfície de uma placa de Petri.
- congénita** – Refere-se a uma condição que já está presente no nascimento e pode persistir depois disso.
- constitutivo** – Descreve um estado de atividade que ocorre em um estado constante e é, portanto, não-responsivo à modulação por reguladores fisiológicos, ou um tipo de controle que gera um produto constante.
- contracoloração** – Procedimento histológico no qual a entidade microscópica de interesse é observada no contexto ou é contrastada com outras entidades colorindo tal entidade com um diferente corante ou outra substância.
- contralateral** – Refere-se ao lado oposto.
- corpúsculo de Barr** – O cromossomo X condensado inativo encontrado em cada uma das células das células de fêmeas de mamíferos placentários.
- cripta** – Uma cavidade profunda na parede do intestino delgado ou grosso na qual ocorre a proliferação e a diferenciação inicial de células-tronco de enterócitos.
- crise** – Estado emergente quando as células perdem telomerase de comprimento adequado, resultando em fusão extremidade-extremidade dos cromossomos, caos do cariótipo e morte celular por apoptose.
- crista neural** – Região do embrião jovem que serve como precursora de diversos tecidos especializados e tipos celulares, incluindo certas células do sistema nervoso periférico, ossos da face, melanócitos e diversos tipos de células neurosecretoras.
- cromátide** – Um meio cromossomo que existe após a fase S e antes da fase M; cromátides pareadas são separadas na fase M, na qual cada uma torna-se um cromossomo.
- cromatina** – Complexo de DNA, RNA e proteínas que constitui um cromossomo.
- cultura de tecidos** – Procedimento de propagação de células fora do tecido vivo em vários tipos de frascos e placas.
- decatenação** – Desembaraçamento e separação das hélices de DNA uma da outra, frequentemente realizada pela enzima topoisomerase II.
- degranulação** – Liberação do conteúdo dos grânulos citoplasmáticos dentro do espaço extracelular seguindo um estímulo fisiológico.
- deleção intersticial** – Alteração genética, frequentemente observada por meio de análises de cariótipo, que causa a deleção de um segmento de DNA cromossomal e, além disso, da cromatina a partir da metade do braço cromossomal sem afetar material da extremidade do braço, com subsequente fusão dos segmentos em qualquer lado da deleção.
- dendrograma** – Diagrama no qual entidades proximalmente relacionadas, assim como genes, células ou organismos, são colocadas próximas umas das outras na ramificação, nos ramos de uma árvore multiramificada.
- de novo** – (1) Aparecimento ou formação *de novo*. (2) Que ocorre pela primeira vez.
- dependência de ancoragem** – Requerimento de células normais de aderirem a um substrato sólido antes de crescerem.
- depirimidinação** – Quebra da ligação glicosídica que liga a pirimidina à desoxirribose ou à ribose do DNA ou do RNA, respectivamente.
- depurinação** – Quebra da ligação glicosídica que liga bases purínicas à desoxirribose ou à ribose do DNA ou do RNA, respectivamente.
- dermal** – Refere-se a uma fina cama de células do estroma, principalmente fibroblastos, encontradas debaixo da camada queratinócita da epiderme na pele.
- derme** – Camada estromal da pele, composta principalmente por fibroblastos.
- desaminação** – Perda de um grupo amino de uma molécula maior, como, por exemplo, uma base de DNA.
- desdiferenciação** – Reversão de uma célula diferenciada ao fenótipo de uma célula menos diferenciada, como, por exemplo, sua precursora.
- desintoxicar** – Fazer com que uma substância tóxica vire inofensiva.
- desmineralizar** – Dissolver o componente da apatita inorgânica do osso (p. ex., fosfato de cálcio).
- desmoplásica** – Refere-se ao estroma colagenoso duro, que é formado por fibroblastos e miofibroblastos

- em carcinomas e algumas inflamações crônicas dos tecidos.
- desnaturação** – Processo que leva uma molécula, bem como uma macromolécula (DNA, RNA ou proteínas) a perder sua estrutura tridimensional natural.
- diapedese** – Sequência de passos complexos impossibilitando leucócitos de extravasar do lúmen de um vaso sanguíneo para o tecido parenquimal.
- dicêntrico** – Refere-se ao cromossomo ou cromátide que sustenta dois centrômeros distintos.
- diferenciação** – Processo pelo qual a célula adquire um fenótipo especializado, bem como o fenótipo característico da célula em um tecido particular.
- dímero** – Complexo molecular composto de duas subunidades.
- diploide** – Descreve um genoma no qual todos os cromossomos são presentes em pares, um de cada par sendo herdado de um pai e o outro de uma mãe, com a exceção do cromossomo sexual, que em mamíferos placentários são pareados na configuração XX ou XY.
- displasia** (adj., = **displásica**) – Um tecido pré-maligno composto por células que aparecem de modo anormal formando uma estrutura tecidual que desvia do normal.
- disseminado** – Espalhado amplamente.
- DNA-lixo** – DNA genômico que não pode ser associado a qualquer função biológica.
- dominante** – (1) Refere-se a uma das várias características alternativas (fenótipo) que pode ser especificada por um loco genético; quando o loco é heterozigoto e carrega a informação especificando dois traços diferentes, o traço dominante será aquele realmente exibido. (2) Descreve um alelo de um gene que determina o fenótipo em função da presença de um segundo alelo do gene que especifica um fenótipo diferente. *Veja também* **recessivo**.
- dominante-interferente** – *Veja* Dominante-negativo.
- dominante-negativo** – Refere-se a um alelo mutante de um gene que, quando co-expresso com o alelo tipo selvagem de um gene, é capaz de interferir com o funcionamento do segundo.
- ectoderme** – Camada externa de células em um embrião jovem.
- ectodomínio** – Porção de uma proteína de superfície celular que sobressai da membrana plasmática até o espaço extracelular.
- ectópico** – (1) Refere-se à expressão de um gene em um lugar ou situação fisiológica em que ele normalmente não deveria ser expresso. (2) Refere-se à presença de célula ou tecido em um sítio anatômico em que eles não deveriam ser encontrados naturalmente no corpo. *Ver também* **ortotópico**.
- efeitos fora do alvo** – Efeitos de uma droga em outras moléculas que não a desejada, tais como efeitos de drogas em proteínas não-desejadas.
- eferente** – Refere-se aos sinais enviados.
- efetor** – Um agente (como uma proteína) que realiza o real trabalho de um processo biológico em vez de apenas regulá-lo.
- eficácia** – Habilidade de um agente terapêutico de gerar uma resposta clínica desejada.
- efusão pleural** – Acumulação de células cancerígenas e fluido no espaço entre os pulmões e a membrana pleural circundante.
- eletrofílico** – Refere-se a uma molécula liberada que se liga a um substrato rico em elétrons.
- embolização** – Processo de formação de um êmbolo.
- êmbolo** – Coágulo sanguíneo que pode viajar pela circulação e eventualmente se alojar em algum lugar no corpo.
- emia** – Sufixo que denota um excesso de uma substância ou tipo celular no sangue.
- encapsidação** – Processo de empacotamento de um genoma viral em um capsídeo.
- endocitose** – Processo pelo qual pedaços da membrana plasmática e proteínas associadas são internalizados dentro do citoplasma da células, resultando na formação das vesículas citoplasmáticas. *Comparar com* **exocitose**.
- endócrino** – (1) Refere-se a uma glândula que secreta fluidos na circulação em geral. (2) Refere-se à rota de sinalização de um hormônio ou fator que é feita por células em um tecido, atravessa o sangue e afeta o comportamento de células em outro tecido em um sítio distante. *Veja também* **exócrino**.
- endoderme** – Camada mais interna da célula em um embrião jovem, que é precursora do trato gastrointestinal e de tecidos associados.
- endogamia** – Prática de casamento entre pessoas do próprio grupo étnico, tribo ou clã.
- endógeno** – Originado de dentro de uma célula, tecido ou organismo.
- endométrio** – Revestimento interno epitelial do útero.
- endorreduplicação** – Processo pelo qual um genoma ou porção deste é replicado sem segregação subsequente das cópias replicadas, levando a sua duplicação.
- endossomos** – Vesículas membranosas situando-se mais abaixo da membrana plasmática que são formadas após porções da membrana plasmática invaginarem-se para o citoplasma e serem cortadas da membrana plasmática.
- enterócitos** – Células epiteliais revestindo internamente a parede do lúmen do trato gastrointestinal.
- eosinófilos** – Um granulócito fagocítico móvel que pode migrar do sangue para espaços dos tecidos, exibindo receptores de IgE na superfície celular; acredita-se que os eosinófilos desenvolvem papel importante na eliminação de organismos parasitários.
- epiderme** (adj., = **epidérmico**) – Camada epitelial da pele, composta principalmente por vários queratinócitos em vários estágios de diferenciação.
- epigenético** – Refere-se a alterações no comportamento de uma célula ou no estado de atividade de sua cromatina que não depende da alteração na sequência de nucleotídeos do DNA.
- epitélio** – Uma camada de células que forma o revestimento interno de uma cavidade ou ducto; aqui, está incluído o epitélio especializado que forma a pele.
- epítipo** – Uma estrutura química específica – geralmente um segmento curto de oligopeptídeos de um antígeno de proteína – que é reconhecida e ligada por uma molécula de anticorpo.
- eritroblastose** – Malignidade dos precursores das células vermelhas do sangue; geralmente se refere a uma condição no nascimento.
- eritrócito** – Células vermelhas do sangue.
- eritroleucemia** – Uma leucemia de precursores não-pigmentados das células vermelhas do sangue.
- eritropoiese** – Processo pelo qual as células vermelhas do sangue são formadas.
- eritropoietina** – Fator de crescimento que estimula a produção de células vermelhas do sangue, frequentemente em resposta ao transporte de oxigênio inadequado pelo sangue.
- escamoso** – Referente às células epiteliais que revestem um ducto ou a pele e não têm função secretora.
- escolha de cópia** – Mecanismo de genética molecular pelo qual uma fita de DNA crescente pode selecionar o molde para sua futura elongação a partir de fitas alternativas de DNA complementares.
- esôfagos de Barrett** – Metaplasia na qual epitélio escamoso do esôfago é substituído por célula epitelial secretora de um tipo normalmente encontrado no estômago.
- esporádico** – Descreve uma doença ou condição que ocorre aleatoriamente em uma grande população sem qualquer predisposição aparente, tal como uma causada por uma suscetibilidade herdada geneticamente.
- estereoquímica** – Descrição da estrutura tridimensional de uma molécula (como uma proteína) e a influência que essa estrutura tem no comportamento químico ou bioquímico da molécula.
- estequiométrica** – Uma relação ou uma reação entre duas ou mais espécies moleculares na qual as molaridades relativas das espécies participantes são precisamente especificadas.
- estocástico** – Refere-se a um evento que ocorre aleatoriamente com alguma probabilidade em vez de com uma maneira precisamente predeterminada.
- estoque viral** – Solução de partículas virais usada experimentalmente para infectar células ou organismos.
- estratificar** – Classificar superficialmente entidades similares (p. ex., tumores) em várias categorias ou subclasses distintas.
- estressor** – Um agente que causa algum tipo de estresse fisiológico.
- estroma** – Os componentes mesenquimais dos tecidos e tumores hematopoiéticos e epiteliais, que podem incluir fibroblastos, adipócitos, células endoteliais e vários imunócitos, bem como a matriz extracelular associada.
- estromalização** – Referindo-se ao processo pelo qual o estroma é gerado em um tecido normal ou neoplásico.
- etiologia** (adj., = **etiológico**) – (1) Mecanismo ou agente que é responsável por causar um estado patológico específico. (2) Estudo dos mecanismos causadores de doenças.
- eucariótico** – Refere-se às células grandes, complexas e nucleadas de metazoários, metafíticos e muitos protozoários.
- eucromatina** – Cromatina que contém genes ativos transcricionalmente e é então expandida relativamente (em vez de condensada) e marcada levemente. *Veja também* **heterocromatina**.
- euploide** – (1) Refere-se a uma coleção de cromossomos que correspondem precisamente, em número (em geral diploides) e estrutura, ao arranjo presente em células normais do tipo selvagem. (2) Descreve um cariótipo tendo tal complemento de cromossomos.
- exocíclico** – Refere-se a um grupo químico que sobressai do anel de uma molécula, como, por exemplo, uma base de DNA.
- exocitose** – Processo pelo qual as células secretam produtos armazenando-os em vesículas da membrana citoplasmática que são fusionadas à membrana plasmática, permitindo que os produtos carregados nessas vesículas sejam liberadas dentro do espaço extracelular. *Compare com* **endocitose**.

exócrino – Refere-se a uma glândula que secreta fluidos via um ducto no trato gastrointestinal ou na superfície da pele. *Veja também* **endócrino**.

exógeno – Originado fora de uma célula, tecido ou organismo.

éxon – A porção de um transcrito primário de RNA que é retido no produto do RNA após *splicing*.

expressão – (1) Transcrição de um gene ativo ou síntese de uma proteína a partir disso. (2) Liberação de fluido intersticial de um tecido, causada pela contração de células nesse tecido.

extravasamento – Processo de saída de um vaso sanguíneo ou linfático e invasão de um tecido ao redor.

ex vivo – Ocorrendo fora de um corpo ou organismo vivo.

fagócito – Célula do sistema imune – por exemplo, célula dendrítica ou macrófago – que é especializada em englobar e destruir outras células, fragmentos celulares e outros restos celulares.

fagocitose – Processo no qual uma célula, geralmente um componente do sistema imune, engloba uma partícula (que pode ser outra célula), a internaliza e, em geral, a degrada.

falsa grávida – Referindo-se a uma fêmea que foi colocada em estado muito parecido com o da gravidez, por meio da exposição a certos hormônios.

familiar – Refere-se a um traço ou uma síndrome que é herdado e, portanto, encontrado em grupos em algumas famílias.

família de gene – Grupo de genes que são descendentes evolutivamente de um gene ancestral comum. Os membros de uma família de gene com frequência codificam proteínas distintas estruturalmente relacionadas.

farmacocinética – Cinética que descreve o aumento e a queda da concentração de uma droga no corpo, geralmente medida no soro.

farmacodinâmica – Acompanhamento do tempo de respostas em um tecido, ou suas células, que são induzidas por uma droga.

farmacológico – Refere-se a uma droga, geralmente um composto de baixo peso molecular.

fase de leitura – (1) A sequência de bases de um gene que codifica para a sequência de aminoácidos de uma proteína. (2) O registro de um triplo códon nessa sequência permite a correta tradução da sequência da proteína.

fator angiogênico – Tipo de fator de crescimento que é especializado na indução da angiogênese.

fator de crescimento – Proteína que é capaz de estimular o crescimento e/ou a proliferação de uma célula pela ligação a um receptor de superfície celular específico apresentado por aquela célula.

fator de transcrição – Proteína envolvida na regulação da transcrição de um gene, frequentemente pela associação com sequências na região promotora do gene.

fator tecidual – Glicoproteína da superfície celular expressa por diversos tipos celulares no corpo que interage com fatores de coagulação no plasma, iniciando, assim, a cascata de coagulação.

fenocópia – Estado fenotípico criado por um gene ou por mecanismo regulatório que está proximalmente relacionado ao estado criado por um gene ou mecanismo regulatório diferente.

fenótipo – (1) Medida ou observação das características de um organismo. (2) A soma de todas as características de um organismo.

feocromocitoma – Tumor das células neuroectodermiais das glândulas adrenais.

fibrina – Proteína que é formada pela clivagem do fibrinogênio plasmático e montada para formar as fibras que ligam as plaquetas nos coágulos.

fibrinogênio – *Veja* **fibrina**.

fibrinólise – Dissolução de maços de fibrina ativada por certas proteases.

fibroblastos – Tipo de células mesenquimais que é comum em tecido conjuntivo e em compartimento estromal de tecidos epiteliais e é caracterizado pela secreção de colágeno.

fibrócito – Células da circulação relativamente não-diferenciadas originadas na medula óssea que expressam colágeno, aderem fortemente ao substrato quando cultivadas *in vitro* e parecem servir como precursoras de fibroblastos e/ou miofibroblastos no tecido para o qual foram recrutadas.

fibrose – Desenvolvimento em um tecido, com frequência gerando inflamação crônica de denso estroma fibroso que substitui epitélio presente normalmente, resultando em perda da função desse tecido.

filopódio – Protrusão filamentosa da superfície celular semelhante a estaca, geralmente se estendendo da borda de um lamelipódio, que pode ser usada pela célula para explorar o território que está a sua frente.

fisiologia – (1) Funcionamento biológico das células, tecidos, órgãos e organismos. (2) O estudo disso.

foco (pl., = **focos**) – Um grupo de células transformadas crescendo no meio de uma camada única de células normais em cultura.

fosfatase – Enzima que remove grupos fosfato de substratos fosforilados, como resíduos de fosfoaminoácidos em uma proteína ou inositol fosforilado de um fosfolípido.

fosfoproteína – Uma proteína na qual um ou mais grupos fosfato foram covalentemente ligados.

fosforilação – Ligação covalente de um grupo fosfato a um substrato, frequentemente uma proteína.

fusogênico – Capaz de causar a fusão de membranas como, por exemplo, a membrana plasmática de duas células adjacentes.

gametogênese – Processo que gera gametas, por exemplo, espermatozoides e óvulos.

gástrico – Refere-se ao estômago.

gastrulação – Um estado recente da embriogênese no qual o embrião, inicialmente composto por uma camada externa de células ectodermiais, desenvolve uma cavidade interna que serve como precursora de camadas celulares endodermiais e mesodermiais.

gatekeeper

Um gene que opera para prevenir multiplicação celular ou favorecer diferenciação ou morte celular e, dessa forma, previne o aparecimento de células neoplásicas.

gene housekeeping – Um gene que é usado virtualmente em todas as células do corpo independentemente do seu estado diferenciado e é essencial para a viabilidade celular.

gene tecido-específico – Gene expresso em certos tipos de tecidos individuais.

gene supressor de tumor – (1) Gene cuja inativação parcial ou completa, ocorrendo tanto em células germinativas quanto no genoma de células somáticas, leva a uma probabilidade maior de desenvolver um câncer. (2) Um gene que é responsável pela restrição da proliferação celular. *Veja também* **gatekeeper**.

genômica funcional – (1) Tecnologia na qual fenótipos celulares são avaliados pela medida do nível de expressão de genes múltiplos, geralmente em

uma numeração de mil, nas células. (2) Análise realizada comparativamente pelo exame de vários tipos celulares ou tecidos que existem em diferentes condições de desenvolvimento, patológicas ou fisiológicas.

genótipo – (1) Constituição genética de um organismo. (2) Base genética de uma característica de um organismo.

genotóxico – Refere-se a um agente que é capaz de danificar o genoma, por exemplo, agente mutagênico.

glicosaminoglicano – Um polissacarídeo carregado da matriz extracelular – por exemplo, sulfato de condroitina, ácido hialurônico ou heparina – que é ligado covalentemente ao centro de uma proteína e é composto por monossacarídeos repetidos, alguns dos quais são aminoaçúcares.

glicoproteína – Uma proteína que foi modificada pós-traducionalmente por meio da adição de cadeias laterais de carboidratos.

glicosilação – Ligação covalente à cadeia lateral de um açúcar, incluindo uma rede de açúcares covalentemente ligados, a uma segunda molécula, por exemplo, a um resíduo de asparagina de uma proteína.

glicosilase – Uma enzima que cliva uma ligação glicosídica, tal como uma que liga uma base de pirimídina a um açúcar de ribose ou de desoxirribose.

glioblastoma – Tumor das células não-neuronais da glia no cérebro.

glioma – *Veja* **glioblastoma**.

gráfico de Kaplan-Meier – Uma convenção para representar diversas observações clínicas nas quais a porcentagem de pacientes sobreviventes (ou outro parâmetro clínico como sobrevivência livre de doença ou progressão) é inserida na ordenada, enquanto o curso do tempo após o diagnóstico inicial ou tratamento é inserido (geralmente em incrementos de meses ou anos) na abscissa.

granulócito – Leucócito que contém grânulos citoplasmáticos – por exemplo, um basófilo, um eosinófilo ou um neutrófilo.

gray (Gy) – Unidade de exposição da radiação equivalente a absorção de 1 joule de energia por quilograma de tecido exposto.

hamartoma – Supercrescimento benigno de um tecido que normalmente envolve células mesenquimais; por exemplo, hamartomas gastrintestinais são caracterizados por uma expansão benigna de células estromais, com frequência com concomitante hiperplasia de células epiteliais adjacentes.

haplóide – Descreve um genoma no qual todos os cromossomos estão presentes em cópia única.

haploinsuficiência – Estado no qual a presença de apenas uma cópia funcional única de um gene gera um mutante ou um fenótipo parcialmente mutante.

hematógeno – Dependendo da ou facilitado pela circulação sanguínea.

hemangioblastoma – Tumor dos precursores das células endoteliais que formam os vasos sanguíneos.

hematopoiese (adj., = **hematopoiético**) – Formação de todos os tipos de células do sangue, incluindo células brancas e vermelhas e vários tipos celulares do sistema imune.

hemidesmosomo – Um grupo de moléculas de integrina situadas na superfície basal de células epiteliais e usadas para ancorar essas células à membrana basal.

hemimetilado – Refere-se a uma molécula de DNA na qual apenas uma das duas fitas complementares de um segmento de DNA particular é metilada.

hemizigossidade – Presença de apenas uma cópia de um gene autossômico por célula.

heparina – Um glicosaminoglicano da matriz extracelular.

hepatócito – Tipo de célula epitelial que forma a maior parte do fígado e é responsável por virtualmente toda a sua atividade metabólica.

hepatoma – Tumor do fígado, também conhecido como **carcinoma hepatocelular**.

herceptina – Anticorpo monoclonal quimérico anti-HER2/Neu suportando um domínio que combina antígeno de ratos (variável) e um domínio constante de humanos (também chamado Trastuzumab).

heterocácion – Célula carregando dois (ou mais) núcleos distintos geneticamente.

heterocromatina – Cromatina que contém genes transcionalmente inativos ou mesmo não os contém e é condensada e marcada fortemente. *Véja também eucromatina.*

heterodímero – Complexo molecular composto por duas subunidades distintas.

heterotípico – Refere-se a interações entre dois ou mais tipos celulares. *Véja também homotípico.*

heterotrímero – Uma molécula que é composta por três subunidades diferentes, como três cadeias protéicas diferentes.

heterozigoto – Refere-se à configuração de um loco genético no qual duas cópias de um gene associadas carregam diferentes versões (alelos) do gene.

hidrocarboneto – Uma molécula composta por átomos de carbono e hidrogênio.

hidrocarboneto aromático policíclico – Hidrocarboneto que carrega múltiplos anéis de benzeno.

hidrofílico – Refere-se a porção ou ambiente químico que prefere associação com a água. *Compare com hidrofóbico.*

hidrofóbico – Refere-se a porção ou ambiente químico que evita interação direta com a água. *Compare com hidrofílico.*

hipercalcemia – Presença de elevadas concentrações de íons de cálcio no sangue.

hiperfosforilado – Refere-se à elevada fosforilação (de uma proteína).

hiperinsulinemia – Nível elevado de insulina circulante.

hiperoxia – Estado de tensão do oxigênio que está acima dos níveis fisiológicos.

hiperplasia (adj. = **hiperplásico**)

Acumulação de número excessivo de células aparentemente normais em um tecido.

hipofosforilado – Refere-se a uma fosforilação relativamente fraca (p. ex., de uma proteína).

hipoxia – Estado de tensão de oxigênio abaixo do normal.

histo- – Refere-se a tecido.

histocompatibilidade – Habilidade de tecidos ou células de serem tolerados por um sistema imune de um organismo hospedeiro dentro do qual foram enxertados.

histologia – Estudo da estrutura do tecido em nível microscópico. *Véja também histopatologia.*

histopatologia – Estudo da estrutura do tecido em nível microscópico frequentemente com referência a tecido anormal. *Véja também patologia.*

holoenzima – Enzima que é montada de múltiplas subunidades que colaboram mediando e regulando a atividade enzimática.

homodímero – Complexo molecular composto por duas subunidades idênticas.

homofílico – Descreve uma molécula que se liga preferencialmente a uma ou mais moléculas de um mesmo tipo.

homólogo – Um gene que é relacionado a outro pela descendência evolutiva de um gene ancestral comum.

homopolímero – Um polímero que é montado a partir de monômeros de um tipo simples, como, por exemplo, um ou outro dos quatro desoxirribonucleotídeos possíveis.

homotetrâmero – Uma montagem de quatro subunidades idênticas; geralmente se refere a proteínas.

homotípico – (1) Refere-se à interação entre duas células do mesmo tipo; *véja também heterotípico.* (2) Refere-se a interações entre moléculas do mesmo tipo.

homozigoto – Refere-se à configuração de um loco genético no qual duas cópias de um gene carregam versões idênticas (alelos) de um gene.

humanizar – Transmitir propriedades humanas para alguma coisa, por exemplo, para uma molécula de anticorpo.

humoral – Refere-se à substância solúvel ou a um fluido.

idiotipo – A estrutura antigênica que é criada pela sequência de aminoácidos formando a bolsa de combinação do antígeno de uma molécula de anticorpo.

imortalidade – Característica de uma célula ou população de células de se proliferarem indefinidamente.

imortalidade replicativa – *Véja imortalidade.*

imortalização – Processo no qual uma população de células que normalmente possui potencial replicativo limitado adquire a habilidade de se multiplicar indefinidamente.

imunidade cruzada – Imunidade que emergiu inicialmente contra um antígeno particular ou agente infeccioso que subsequentemente confere imunidade contra outros antígenos distintos ou agentes infecciosos.

imunização passiva – Procedimento no qual as respostas imunes de um organismo são suplementadas ou reforçadas por meio da introdução de agentes imunológicos, normalmente anticorpos, de origem externa.

imunócito – Uma célula associada a um dos ramos funcionais do sistema imune.

imunocoloração – Uso de anticorpos para marcar células específicas ou estruturas subcelulares presentes em seções histológicas.

imunocompetente – Refere-se a um organismo cujo sistema imune é completamente funcional.

imunocomprometido – Descreve um organismo com sistema imune que não é completamente funcional.

imunodeficiente – *Véja imunocomprometido.*

imunoedição – Processo no qual o sistema imune permite que alguns tumores fracamente imunogênicos sobrevivam, enquanto elimina seletivamente aqueles que são fortemente imunogênicos.

imunoevasão – Qualquer estratégia biológica que permite que uma célula anormal ou um agente infeccioso se esquive da detecção ou eliminação pelo sistema imune.

imunofluorescência – Uso de anticorpos ligados direta ou indiretamente a corantes fluorescentes com o propósito de corar seções de tecidos, mostrando os anticorpos que são especificamente reconhecidos por tais anticorpos.

imunógeno (adj., = **imunogênico**)

Estrutura química que é capaz de provocar uma resposta imune específica, por exemplo, um antígeno que passa a provocar a síntese de moléculas de anticorpo capazes de reconhecê-lo e se ligar a ele.

imunoglobulina – Molécula protéica que se agrupa para formar uma molécula funcional de anticorpo.

imuno-histoquímica – Procedimento no qual o antígeno é localizado em uma seção histológica por meio do uso de um anticorpo que foi acoplado a uma enzima (p. ex., peroxidase) capaz de gerar um produto visível sobre a luz de microscópio.

imunovigilância – Processo no qual o sistema imune está continuamente monitorando os tecidos para a presença de células anormais, incluindo células cancerosas.

imunoprecipitação – Processo de precipitar uma molécula usando um anticorpo específico que reconheça e se ligue a essa molécula.

imunoproteossoma – Um proteossoma, normalmente encontrado em células apresentadoras de antígeno profissionais, especializado em gerar oligopeptídeos para apresentação por moléculas MHC na superfície celular.

imunotoxina – Toxina que é alvo de certos tecidos ou células por ter sido acoplada a um anticorpo antígeno-específico, normalmente anticorpo monoclonal.

independência de ancoragem – Habilidade de uma célula de proliferar sem a aderência a um substrato sólido.

índice de massa corporal – Peso em quilogramas dividido pelo quadrado da altura em metros.

índice terapêutico – (1) Medida da extensão na qual um tratamento afeta um tecido doente alvo, tal como um tumor, comparada com seus efeitos em tecidos normais não-alvejados. (2) A razão desses dois efeitos.

inibição da densidade – *Véja inibição por contato.*

inibição por contato – Comportamento exibido por células propagadas em cultura de monocamada: as células irão continuar a proliferar até que toquem umas às outras, após o que elas param de proliferar.

iniciação – (1) Processo de mudança celular, normalmente de forma estável, para que seja possível responder subsequentemente a ações estimuladoras de crescimento de um agente promotor. (2) Tal processo, com a implicação que a mudança envolve uma mutação. (3) A primeira etapa em tumorigênese de múltiplas etapas.

iniciador – Molécula de DNA ou RNA cuja extremidade 3' serve como ponto de iniciação da síntese de DNA por uma DNA polimerase.

iniciador – Agente que desencadeia a primeira etapa em tumorigênese de múltiplas etapas. *Véja também iniciação.*

incidência – Frequência na qual uma condição ou doença ocorre ou é diagnosticada em uma população.

indicação – O nome para o tratamento de uma doença (ou um tumor) com um certo tipo de terapia sugerida por uma série de parâmetros de diagnóstico.

início atrasado – É referente a genes cuja expressão depende da síntese *de novo* de proteínas e é indu-

- zida com algum atraso após a estimulação por um fator de crescimento de uma célula.
- início imediato** – Refere-se a um grupo de genes cuja expressão é induzida durante a primeira meia hora de estimulação pelo fator de crescimento de uma célula, mesmo quando a síntese proteica está inibida.
- inóculo** – Material inoculado.
- in situ** – (1) Ocorrendo no local de origem. (2) No caso de carcinomas, restrito ao lado epitelial da membrana basal.
- integração** – Inserção de um fragmento externo de DNA (p. ex., o DNA de um genoma de um vírus infectante) dentro do DNA cromossômico de modo que o DNA viral torna-se covalentemente ligado aos segmentos de DNA cromossômicos flanqueadores de ambos os lados.
- integrina** – Receptor heterodimérico da superfície celular que liga componentes da matriz extracelular e transmite informação sobre o ligante para o interior da célula; o domínio citoplasmático de uma integrina pode também estar acoplado a componentes de citoesqueleto, com isso ligando a matriz extracelular ao citoesqueleto.
- interfase** – Porção do ciclo celular fora da mitose.
- interleucina** – Fator de crescimento e diferenciação que estimula diversos componentes celulares do sistema imune.
- internalização** – Processo no qual proteínas e outras moléculas são importadas para um corpo; geralmente se refere à importação de moléculas para dentro das células.
- intersticial** – Refere-se ao espaço dentro de um tecido que se localiza entre as células.
- intra-epitelial** – (1) Refere-se à troca ou a um atributo dentro do epitélio. (2) Refere-se a uma neoplasia que permanece no lado epitelial da membrana basal.
- intravaso** – Processo de invasão de vasos sanguíneos ou linfáticos a partir de tecido circundante.
- intravital** – Refere-se ao processo que ocorre em tecido vivo, tal como imaginar um processo como ele ocorre em um tecido vivo.
- intron** – Porção de um RNA transcrito primário deletada durante o processo de *splicing*.
- in utero** – Ocorre no útero durante desenvolvimento embrionário ou fetal.
- invasão** – (1) Processo no qual células cancerosas ou grupos delas passam de um tumor primário para um tecido normal adjacente. (2) No caso de carcinomas, um movimento que envolve uma abertura na membrana basal.
- in vitro** – (1) Ocorrendo em cultura de tecidos, em lisado celular ou em sistemas de reação purificados em tubo de ensaio. (2) Refere-se a propagação de células vivas em um frasco (p. ex., placa de Petri) em vez de em tecido vivo.
- in vivo** – (1) Ocorrendo em organismo vivo. (2) Ocorrendo em célula viva e intacta.
- invólucro** – Regressão ou desaparecimento de um tecido, notavelmente a regressão de um epitélio mamário por desmame.
- isoforma** – Proteína que é funcional e estruturalmente similar a outra proteína.
- janela terapêutica** – Faixa de concentração de uma droga que é maior do que a necessária para obter um efeito terapêutico e mais baixa do que a dose máxima tolerada.
- junções aderentes** – Junções laterais entre células adjacentes, principalmente, células epiteliais, que servem para, mecanicamente, unir seus citoesqueletos de actina no citoplasma.
- lábil** – Alta suscetibilidade para mudar, incluindo alteração ou destruição.
- laço efetor** – A região da proteína Ras que participa da interação física direta com uma das suas proteínas efetoras; tal interação geralmente leva à ativação funcional da proteína efetora.
- lamelipódio** – Ondulação ampla, semelhante a uma folha, que se estende da membrana plasmática até o espaço intracelular e é tipicamente encontrada na borda direcional de uma célula que se locomove.
- lâmina basal** – *Veja membrana basal.*
- leiomioma** – Tumor benigno de células mesenquimais formando a parede do útero.
- leucemia** – Malignidade de qualquer variedade de célula hematopoiética, incluindo as linhagens que levam a linfócitos e granulócitos, na qual as células tumorais não são pigmentadas e dispersas ao longo da circulação.
- leucemogênese** (adj., = -gênico) – Processo que gera leucemia.
- leucócito** – Célula sanguínea branca não-pigmentada, como o linfócito, o monócito, o macrófago, o neutrófilo ou o mastócito.
- leucose** – Doença tipo leucemia das galinhas.
- ligante** – Molécula que se liga especificamente a um receptor e ativa seus poderes de sinalização.
- ligase** – Uma enzima que junta covalentemente a extremidade de duas moléculas; no contexto do DNA, ligases unem a extremidade 3' de um DNA fita simples à extremidade 5' de outro pela ligação fosfodiéster.
- limitante da velocidade** – Refere-se a um passo de um processo de múltiplas etapas que controla a taxa geral na qual o processo é terminado, pois esse passo é cineticamente mais lento do que os outros que ocorrem.
- linhagem** – Sucessão linear de células estendendo-se de um ancestral celular para seus descendentes.
- linhagem celular** – Uma cepa de células que foi adaptada para crescer continuamente em meio de cultura.
- linhagem germinativa** – (1) Coleção de genes que é transmitida de uma geração de organismos para outra. (2) As células de um organismo multicelular que são responsáveis por carregar e transmitir genes a partir de uma geração de organismos para sua prole.
- loco** – Sítio cromossômico que pode ser geneticamente estudado e presume-se estar associado a um gene específico.
- laço T** – Configuração em forma de laço no final de um DNA telomérico que envolve a inserção de uma fita pendente 3' em sua região dupla-fita.
- lúmen** (adj. = luminal) – Estrutura em forma de tubo, oca, como uma passagem estreita, tal como o intestino, um bronquíolo do pulmão, um vaso sanguíneo ou um ducto em um órgão secretor.
- luminal** – Refere-se a células que forram e cobrem o interior do lúmen de uma estrutura em forma de tubo.
- linfa** – Fluido intersticial entre células que é drenado pelos nódulos linfáticos para grandes vasos linfáticos que finalmente esvaziam dentro da circulação venosa.
- linfangiogênese** – Processo de formação de novos vasos linfáticos.
- linfocina** – Uma citocina ou fator de crescimento especializado em atrair e/ou ativar linfócitos.
- linfócitos** – Classe de leucócitos que medeia imunidade humoral ou celular, envolvendo células B, células T, células NK e derivados dessas células.
- linfóide** – (1) Refere-se ao sistema linfático. (2) Refere-se à linhagem de células hematopoiéticas que geram linfócitos B e T, assim como células matoras naturais.
- linfoma** – Tumor sólido de células linfóides.
- lisado** – Produto da dissolução da estrutura de um tecido ou uma população de células, geralmente criado com o objetivo de liberar os componentes internos do tecido ou das células.
- lisossomo** – Vesícula lipídica citoplasmática que contém enzimas de degradação em solução de baixo pH, permitindo que elas degradem várias moléculas que são introduzidas nela.
- lítico** – Dissolve célula ou tecido; frequentemente associados aos potentes efeitos citopáticos de certos vírus em células hospedeiras específicas.
- microdissecção por captura a laser** – Procedimento no qual o raio *laser* é usado para dissecar um remendo de células distantes de outras células presentes em uma secção de tecidos que foi montada em uma lâmina de microscópio.
- macronúcleo** – Maior de dois núcleos em muitas células ciliadas, que carregam múltiplas cópias de cada gene, e é utilizado para produção de mRNAs.
- maligno** – Descreve um crescimento que mostra evidência de ser localmente invasivo e também possivelmente metastático.
- mamária** – Refere-se ao seio e suas glândulas de produção de leite.
- manchas café-com-leite** – Manchas da cor de café-com-leite na pele que são vistas caracteristicamente na síndrome neurofibromatose tipo 1.
- marcador substituto** – Parâmetro de medida, frequentemente de diagnóstico, que serve para indicar o comportamento de outro processo a cujo comportamento ele é paralelo e reflete.
- corante vital** – Corante que pode ser usado para corar células ou tecidos e é retido por longos períodos nesses objetos sem comprometer sua viabilidade.
- mastócitos** – Uma célula originária da medula óssea que produz receptores Fc para IgE e sofre degradação mediada por IgE seguida do encontro com certos antígenos.
- matriz extracelular** – Rede de proteínas secretadas, principalmente glicoproteínas e proteoglicanas, que circundam a maioria das células dentro dos tecidos e criam uma estrutura dentro do espaço intercelular.
- medicação** – Refere-se ao uso de drogas, em vez de cirurgia, para tratamento de doenças.
- meduloblastoma** – Tumor de precursores primitivos de neurônios no cerebelo.
- megacariócito** – Célula grande do sistema hematopoiético que produz plaquetas por retirar fragmentos do seu citoplasma.
- meia-vida** – (1) Tempo durante o qual metade da população de moléculas metabolicamente instáveis decai ou é eliminada ou o tempo requerido para que metade de um sinal fisiológico decresça. (2) Tempo no qual 50% dos átomos de uma quantidade de um isótopo radiativo decai.
- melanina** – Pigmento marrom ou preto que é sintetizado por melanócitos e, na pele, transferido para queratinócitos basais, criando, assim, a pigmentação da pele.
- melanócito** – Célula originária da crista neural que cria pigmentação da pele e da íris.
- melanoma** – Tumor que se desenvolve de melanócitos, células pigmentadas da pele e da íris.
- melanossoma** – Corpo que contém melanina no citoplasma de um melanócito que é transferido para

- queratinócito com a função de transmitir pigmentação para o queratinócito.
- membrana basal** – Uma matriz extracelular especializada que forma uma camada separando células epiteliais de células do estroma ou células endoteliais de pericitos; *algumas vezes chamada de lâmina basal*.
- justamembrana** – Localizada adjacente a uma membrana.
- membrana plasmática** – Dupla camada lipídica que circunda uma célula eucariótica e separa o ambiente aquoso do citoplasma do espaço extracelular.
- menarca** – Tempo na vida quando o ciclo menstrual inicia.
- mesenquimal** – (1) Refere-se ao tecido composto de células de origem mesodérmica, incluindo fibroblastos, células da musculatura lisa, células endoteliais e imunócitos. (2) Refere-se a um tipo celular individual pertencente a essa classe de células.
- mesoderma** – Camada de células intermediária de um embrião jovem, a qual encontra-se entre o ectoderma e o endoderma, que é o precursor do tecido mesenquimal incluindo tecido conjuntivo e sistema hematopoiético.
- metabolismo intermediário** – Conjunto de reações bioquímicas de uma célula que permite a interconversão de diversas espécies moleculares em outras.
- metábolo** – Espécie química resultante da conversão metabólica por enzimas de uma espécie de precursores químicos.
- metáfase** – Segunda subfase da mitose, durante a qual ocorre completa condensação dos cromossomos e ligação ao feixe mitótico quando a membrana nuclear desaparece; nesse momento, os cromossomos estão prontos para serem vistos sob a luz do microscópio.
- metafita** – Plantas compostas por muitas células.
- metalo-proteína** – Protease que contém um átomo de metal, normalmente zinco, em seu sítio catalítico.
- metaplasia** – Substituição de células de um tecido de uma linhagem de diferenciação por células de outra linhagem.
- metástase** – Crescimento maligno formado em uma localização do corpo; as células desse crescimento derivam de malignidade localizada em outra parte do corpo.
- metazoa** – Animais compostos por muitas células.
- metilase de manutenção** – Enzima que liga grupos metil a um CpG não-metilado que é complementar ao CpG metilado em uma dupla hélice do DNA.
- metilase de novo** – Uma enzima que liga um grupo metil ao C de um dinucleotídeo CpG na ausência de metilação do CpG complementar.
- micrometástase** – Metástase composta de uma única célula ou de uma pequena massa celular que é aparente apenas através do microscópio.
- micronúcleo** – (1) Pequeno fragmento de núcleo que possui sua própria membrana nuclear e resulta de certas aberrações na divisão celular ou do dano causado na célula. (2) Menor de dois núcleos normalmente presentes em muitas células ciliadas, que é usado para carregar e transmitir o genoma ciliado às células da prole.
- microsatélite** – Bloco de sequência de DNA que consiste na sucessão de repetidas unidades de sequência de nucleotídeos idênticos ou similares.
- microtrombo** – *Veja êmbolo*.
- mielocitomatose** – Malignidade da medula óssea de aves.
- mielogênico** – Originado da medula óssea. *Veja também mielóide*.
- mielóide** – (1) Refere-se à linhagem de células hematopoiéticas que geram granulócitos, macrófagos e mastócitos. (2) Pertencente ou parecido com a medula óssea; frequentemente usado como sinônimo para mielogênico.
- mieloma** – Malignidade de células produtoras de anticorpos da medula óssea, frequentemente chamado de **mieloma múltiplo** para indicar o grande número de lesões osteolíticas que são encontradas em pacientes com a doença em estado avançado.
- mieloproliferativo** – Refere-se a proliferação excessiva e elevados níveis resultantes de um dos diversos tipos celulares gerados pela ramificação mielóide do sistema hematopoiético.
- minuto duplo** – Um segmento cromossômico que se torna separado do cromossomo no qual normalmente reside e é capaz de perpetuar-se como uma partícula extracromossômica descolada de um centrômero.
- mioblastos** – Precusores não-diferenciados dos miócitos presentes no músculo direcionado.
- miofibroblasto** – Tipo de fibroblasto envolvido na cicatrização de um ferimento e na inflamação frequentemente definido pela expressão de actina- α de musculatura lisa que, junto com a miosina, transmite seu poder contrátil.
- mitógeno** (adj., = **mitogênico**) – Agente que provoca proliferação celular.
- mitose** – (1) Divisão celular composta por quatro passos: prófase, metáfase, anáfase e telófase. (2) Mais propriamente, processo pelo qual uma única célula separa seu complemento de cromossomos em dois conjuntos iguais na preparação para divisão em duas células-filhas.
- modificação pós-traducional** – Alteração covalente de uma proteína ocorrendo depois do início da polimerização do esqueleto polipeptídico dela.
- motivo de sequência** – (1) Pequena sequência de oligonucleotídeo que está associada caracteristicamente a uma ou outra função biológica. (2) Sequência de aminoácido que está caracteristicamente associada ao aspecto funcional ou estrutural de uma proteína.
- monocamada** – População de células crescendo como uma única camada celular espessa.
- monócito** – Leucócito fagocítico que circula brevemente no sangue antes de migrar para os tecidos em que será diferenciado em macrófago.
- monoclonal** – Descreve uma população de células, as quais derivam diretamente de uma célula ancestral comum.
- monômero** – Molécula composta por uma única unidade ou única subunidade de um tipo capaz de formar complexos de maior peso molecular por associação ou ligação covalente a unidades similares ou idênticas.
- monoterapia** – Terapia em que uma única droga é utilizada de cada vez.
- monozigótico** – Oriundo de um único óvulo fertilizado, referindo-se a gêmeos idênticos.
- morfógeno** – Substância que induz células a construir tecidos de um certo aspecto e forma.
- morfogênese** – Processo no qual a forma é criada, frequentemente referindo-se à criação da forma de várias estruturas durante o desenvolvimento embrionário.
- morfologia** – Aspecto e forma de uma célula, tecido ou organismo.
- mortal** – Refere-se à população celular que possui capacidade proliferativa limitada.
- mortalidade** – Taxa ou frequência de morte a partir de uma condição de doença particular.
- morte celular programada** – *Veja apoptose*.
- motilidade** – Tendência a movimento, frequentemente de células individuais, de um local para outro.
- motogênico** – Refere-se a um agente ou sinal que estimula movimento ou motilidade celular.
- mucosa** – Camada de célula epitelial que secreta uma substância tipo muco formando uma camada protetora acima das células secretoras.
- mudança de classe** – O rearranjo do gene que ocorre em um gene de imunoglobulina no qual uma região de sequência variada ligadora de antígeno já formada é trocada da sua justaposição com uma região constante por outra região com sequência constante, resultando em uma mudança na codificação da região constante de uma molécula de anticorpo pelo mRNA da imunoglobulina.
- multiparturiante** – Refere-se a uma mulher que deu à luz inúmeras vezes.
- multipotente** – Refere-se à habilidade de uma célula-tronco de se diferenciar em múltiplos tipos celulares distintos.
- mural** – Refere-se à camada externa de vasos sanguíneos, que é composta de pericitos e células de musculatura lisa e circunda células endoteliais lumbais.
- murino** – Refere-se a um subgrupo de roedores que inclui camundongos e ratos.
- mutação** – Alteração no genótipo de uma espécie que pode envolver uma alteração na sequência nucleotídica de um segmento de DNA, no arranjo de um segmento de um cromossomo, no número de cópias de um segmento, na estrutura física de um cromossomo e até mesmo no número de cópias de uma estrutura de cromossomo normal.
- mutagênese por inserção** – Processo em que o gene se torna mutado por meio da inserção ou integração de outro elemento genético (como um vírus retroviral) nas proximidades do DNA cromossômico.
- mutação de sentido trocado** – Mutação que causa a substituição de um aminoácido.
- mutação neutra** – Alteração na sequência de DNA que não possui nenhum efeito no fenótipo, incluindo mutações que não causam efeito na estrutura proteica.
- mutação sem sentido** – Mutação que causa terminação prematura de uma cadeia proteica crescente.
- mutação pontual** – Substituição de uma única base por outra em uma sequência de DNA.
- mutação somática** – Mutação que fere o genoma de uma célula fora da linhagem germinativa; tal mutação não pode, por definição, ser transmitida para a próxima geração do organismo.
- mutágeno** (adj., = **mutagênico**) – Agente que induz a mutação.
- não-disjunção** – (1) Falha na separação de duas cromátides durante a mitose ou de dois cromossomos homólogos durante meiose. (2) Estado criado por essa falha de separação.
- não-invasivo** – Refere-se a procedimentos que permitem diagnósticos ou tratamento sem precisar penetrar no corpo com instrumentos de diagnóstico ou cirurgia.
- natal** – Refere-se a nascimento.
- necrose** – Processo de morte celular envolvendo o colapso celular e de seus constituintes através de passos que são distintos daqueles do programa de morte por apoptose.

neovascularização – Vascularização desenvolvida recentemente.

neoplasia (adj., = **neoplásica**) – (1) Estado de crescimento canceroso. (2) Tumor benigno ou maligno composto por células que possuem aparência anormal e padrão de proliferação anormal.

neoplasma – Um tumor. *Veja também* **neoplasia**.

neuroectodermal – Refere-se a componentes do sistema nervoso que derivam do ectoderma embrionário.

neurofibroma – Tumor de células benignas formando uma camada em volta dos axônios dos nervos.

neuropeptídeos – Oligopeptídeos que são liberados por certas células do sistema nervoso central ou por células neuroendócrinas e agem sobre outras células dentro e fora do sistema nervoso central.

neurosecretores – Refere-se a um tipo celular que irá secretar uma substância, como um hormônio, em resposta a sinalização neuronal.

neutralização – Inativação de uma atividade biológica, assim como a inativação da infectividade viral por moléculas de anticorpo.

neutrófilo – Granulócito abundante na circulação que expressa receptores Fc e é responsável pelo reconhecimento e englobamento de diversos agentes infecciosos, especialmente bactérias.

neutropenia – Deficiência de neutrófilos na medula e na circulação.

nicho (célula-tronco)
Local funcional que suporta a proliferação de células-tronco e as impede de diferenciar.

normoxia – Um nível de oxigênio que corresponde aquele normalmente experimentado pelas células em um ambiente tecidual específico.

northern blot – Adaptação de procedimento *southern blot* no qual o RNA (em vez do DNA) é resolvido por eletroforese em gel e transferido para um filtro que é subsequentemente incubado com uma sonda de DNA radiomarcada sequência-específica.

nucleofílico – Refere-se a uma molécula que busca e reage com substratos pobres em elétrons.

nucleossomo – Proteína octamérica, composta por duas de cada histonas H2A, H2B, H3 e H4, ao redor da qual o DNA é enrolado em cromatina.

nulipara – Refere-se a uma fêmea que nunca deu à luz.

oculto – escondido, inaparente.

oligômero – Polímero de mais de duas (mas não com um grande número) subunidades.

oligopeptídeo – Curto polímero protéico que consiste em relativamente pequenos números de resíduos de aminoácidos.

oligopotent – Refere-se à habilidade de uma célula menos diferenciada a se diferenciar em vários tipos celulares distintos.

-oma – Denotação de crescimento maligno ou benigno.

oncofetal – Refere-se a um antígeno que normalmente é expresso durante o desenvolvimento embrionário e também é expresso por algumas células tumorais.

oncogene (adj., = **oncogênico**) – (1) Gene indutor de câncer. (2) Gene que pode transformar células.

oncologista – Médico que trata o câncer, normalmente por meio de medicação em vez de meio cirúrgico.

oncoproteína – Proteína especificada por um oncogene.

operável – Capaz de ser tratado com sucesso por cirurgia.

ordenada – Eixo vertical ou *y* do gráfico cartesiano.

ortólogo – Gene em uma espécie que está relativamente mais próximo de um gene em outra espécie; normalmente ortólogos representam correspondentes diretos um do outro no genoma de duas espécies.

ortotópico – Refere-se a um local anatomicamente próprio ou nativo. *Veja também* **ectópico**.

osteoblástica – Refere-se à classe de lesões ósseas que envolvem aumento localizado na quantidade de osso mineralizado. *Veja também* **osteolítico**.

osteoblasto – Tipo celular mesenquimal relacionado a fibroblastos que constrói o osso mineralizado por meio da deposição de uma matriz de colágeno e cristais de apatita.

osteoclasto – Tipo de célula de linhagem de macrófago que serve para degradar e desmineralizar o osso já formado.

osteolítico – Refere-se à lesão óssea que envolve dissolução localizada do osso mineralizado. *Veja também* **osteoblástico**.

osteotropismo – Característica de células, especialmente células cancerosas metastáticas, de migrarem e colonizarem o osso.

papiloma – Uma proliferação adenomatosa benigna de células epiteliais; termo frequentemente usado para descrever lesões benignas na pele.

papovírus – Classe de vírus que inclui SV40, papilomavírus e poliomavírus..

parácrino – Refere-se à rota de sinalização de um hormônio ou fator que é liberado por uma célula e age em uma célula próxima.

paraneoplásico – Refere-se a um efeito biológico provocado no corpo por um tumor em um local no corpo que está localizado a certa distância do tumor propriamente dito e não está, aparentemente, envolvido de forma direta na patogênese do tumor.

parênquima – Porção do tecido que se localiza fora do sistema circulatório e frequentemente é responsável por desenvolver funções especializadas no tecido.

paridade – (1) A condição de ter dado à luz. (2) O número de vezes que uma fêmea deu à luz.

parturiente – Referente a uma mulher que deu à luz no mínimo uma vez.

passagem – Prática de transferir células de um frasco de cultura para outro, frequentemente realizada devido ao preenchimento do primeiro frasco pela população celular. *Veja também* **passagem seriada**.

passagem seriada – A prática de transferir uma população celular de um frasco de cultura para outro e a subsequente retirada de uma alíquota da população celular resultante transferindo-a logo para outro frasco de cultura, repetindo este ciclo por um extenso período.

patogênese – Processo que leva à criação do estado da doença.

patológico (n. = **patologia**) – (1) Doente ou associado a doença. (2) Refere-se ao estudo do processo das doenças, frequentemente em nível de microscopia.

patologista – Médico que examina tecidos microscopicamente para estudar e classificar doenças.

pediátrico – Refere-se ao atributo ou condição de uma criança.

penetrância – Grau ou frequência com o qual o alelo de um gene pode influenciar fenotipicamente – por exemplo, a probabilidade de um alelo de uma linhagem germinativa induzir um fenótipo clínico em um portador do alelo.

peptidase – Enzima que cliva peptídeo.

perforina – Uma proteína criada pelas células imunes citotóxicas e inserida por elas na membrana plasmática das células-alvo; uma vez inseridas as perforinas criam um canal através da membrana que causa morte celular, frequentemente por produzir a introdução de proteínas pró-apoptóticas dentro da célula.

pericitos – Células relacionadas à musculatura lisa que circundam capilares e promovem formação das paredes capilares formadas por células endoteliais com forte tensão e contratilidade.

peritoneal – Refere-se à cavidade do abdome que é delimitada por uma membrana confinada e inclui o trato gastrointestinal inferior e órgãos associados, assim como pâncreas e fígado.

permissivo – (1) Descreve a temperatura que permite o crescimento de um vírus sensível à temperatura. (2) Descreve um tipo de célula hospedeira que permite a proliferação de vírus.

peroxissomo

Organela citoplasmática envolvida na oxidação de vários substratos, especialmente lipídeos.

picnose – Colapso de núcleos dentro de estruturas densamente marcadas.

pimondazol – 1-[(2-hidroxi-3-piperidinil)propil]-2-nitroimidazol hidrocloreto, um composto usado para detectar regiões de hipóxia em um tecido.

plasminogênio – Proenzima inativa que é convertida em protease plasmina ativa por meio da clivagem proteolítica.

pleiotropia – Habilidade de certos genes ou proteínas promoverem concomitantemente uma série de respostas *downstream* em uma célula ou organismo.

pleural – Refere-se ao espaço entre o pulmão e a membrana que circunda o pulmão.

pluripotente – Refere-se à habilidade das células-tronco de originarem a prole que pode participar da formação de todos os tecidos de um embrião, exceto das membranas extraembrionárias.

proteína de bolso – Termo que se refere à pRb e a duas proteínas relacionadas, p107 e p130.

podossomo – Área focal organizada na superfície celular na qual proteases ligadas à membrana plasmática degradam a matriz extracelular na proximidade.

policíclico – Refere-se a moléculas com estruturas que contêm múltiplos anéis covalentemente fechados.

policitemia – Condição envolvendo circulação de células vermelhas em um nível superior ao normal.

policlonal – Descreve uma população de células que traça sua origem por duas ou mais fundações celulares ancestrais (*veja também* **monoclonal**).

bypass polimerase – Uma DNA polimerase que copia uma lesão não reparada da fita molde de DNA, “adivinhandos” os nucleotídeos que devem ser incorporados na fita nascente de DNA complementar para evitar que ocorra a incorporação inadequada e resultante mutação.

polimorfismo de tamanho de fragmento de restrição – Variação na sequência de DNA que pode ser detectada por meio do seu efeito permitindo ou impedindo a clivagem de um segmento de DNA cromossômico por uma enzima de restrição.

polimorfismo genético – Um elemento de sequência variável em um genoma de um organismo que ainda não tem efeito no fenótipo e é transmitido geneticamente como um determinante mendeliano.

polipectomia – Remoção cirúrgica de um pólipso (do cólon).

pólipo – Crescimento adenomatoso; freqüentemente no intestino.

polícáron – Células que contêm múltiplos núcleos em um único citoplasma.

ponto de verificação – Mecanismo de controle que assegura que o próximo passo no ciclo celular não irá acontecer até que uma série de pré-condições tenham sido completadas, incluindo o término de todos os passos anteriores.

ponto de quebra – Local em uma região do cromossomo ou gene no qual este torna-se fusionado por meio da translocação cromossômica com outra região do cromossomo ou gene.

ponto de restrição – Ponto de decisão na fase G_1 tardia do ciclo celular no qual uma célula se compromete a completar as fases restantes do ciclo celular permanecendo em G_1 ou deixando o ciclo celular ativo e entrando em G_0 .

conjunto – População ou conjunto de entidades similares, por exemplo, um conjunto de genes ou células-tronco.

conjunto de genes – Coleção de genes presentes ao longo do genoma de todos os membros de uma espécie.

pós-mitótico – Descreve uma célula que desistiu de entrar novamente no ciclo de divisão e crescimento celular ativo.

potencial para o desenvolvimento de drogas – Refere-se a espécies moleculares, como uma proteína, que têm as propriedades estruturais e funcionais que sugerem que compostos terapêuticos de baixo peso molecular possam ser desenvolvidos com para interagir especificamente com elas e perturbar seu funcionamento.

pré-natal – Ocorre antes do nascimento. *Veja também natal.*

primase – Enzima que inicia a síntese de DNA colocando um curto segmento de RNA na fita molde; a extremidade 3' da hidroxila desse iniciador de RNA serve então de local de ligação do desoxirribonucleotídeo inicial por uma DNA polimerase. *Veja também iniciador.*

primitivo – (1) Refere-se ao fenótipo de uma célula relativamente indiferenciada. (2) Uma célula embrionária.

procarcinógeno – Um composto químico que, enquanto não quimicamente reativo *per se*, pode ser convertido em um carcinógeno altamente reativo, em geral por meio de processo metabólico.

procariótico – Refere-se à célula não-nucleada, relativamente pequena, de bactérias e organismos relacionados.

pró-droga – Precursor inativo de uma droga biologicamente ativa.

produto natural – Espécie química que é produto do metabolismo natural de um organismo, como de uma bactéria, fungo ou planta.

proenzima – Forma cataliticamente inativa de uma enzima que requer algum tipo de alteração (p. ex., clivagem proteolítica) com o objetivo de tornar-se cataliticamente ativa.

prófase – Primeira subfase da mitose, na qual os cromossomos começam a se condensar e centrômeros começam a formar-se.

profilático – Preventivo.

progeria – Síndrome na qual um indivíduo sofre envelhecimento precocemente ou de forma acelerada.

prognóstico – Predição sobre o curso clínico de uma doença, freqüentemente influenciada por análises detalhadas dos seus atributos existentes, como marcadores histopatológicos e bioquímicos.

programa de expressão – A expressão coordenada de uma série de genes.

progressão – *Veja progressão tumoral.*

progressão tumoral – (1) Processo evolutivo composto por múltiplas etapas de uma célula normal para uma célula tumoral. (2) Evolução de uma célula cancerosa benigna para maligna. (3) Evolução de uma célula pré-maligna de um estado promotor dependente para um promotor independente.

promoção – Processo que estimula ou acelera a progressão do tumor; geralmente o faz sem danificar diretamente o genoma.

promotor – (1) Agente que promove a progressão da tumorigênese de múltiplas etapas por mecanismo não-genético, especialmente aqueles envolvendo inflamação e/ou mitogênese. (2) Sequência em um gene que controla sua transcrição.

tendência no diagnóstico – Tendência de uma observação ou conclusão ser influenciada pelas propriedades ou aplicações de uma técnica de diagnóstico em vez de refletir exatamente uma propriedade intrínseca de um estado doente.

protease – Enzima que cliva substratos protéicos.

proteoglicano – Molécula com uma ou mais cadeias de glicosaminoglicanos ligados covalentemente ao centro de uma proteína.

proteólise (adj. = **proteolítico**) – Processo, geralmente mediado por proteases, de clivar um polipeptídeo em fragmentos de baixo peso molecular, incluindo aminoácidos individuais.

proteoma – Tecnologia pela qual são realizadas pesquisas sistemáticas da expressão de grande número de espécies de proteínas distintas em uma amostra biológica, como uma célula lisada ou um fluido biológico.

proto-oncogene – Gene celular normal que, devido a alteração por agentes danificadores de DNA ou genoma viral, pode adquirir a habilidade de funcionar como um oncogene.

pró-vírus – Cópia do DNA dupla-fita de um genoma retroviral que é o produto da transcrição reversa; isso pode existir transitoriamente, como um plasmídeo episomal (não-cromossômico), ou estávelmente, seguindo sua integração no cromossomo e uma célula hospedeira infectada.

pró-vírus endógeno – O pró-vírus de um retrovírus que é transmitido através de uma linhagem germinativa de uma espécie.

pulmonar – Referindo-se aos pulmões.

quarto – Qualquer um de quatro grupos iguais dentro do qual uma ampla amostra de indivíduos ou objetos de teste foi subdividida por meio do uso de uma ou outra técnica de medida.

queratinócito – Tipo de célula epitelial encontrado em tecidos como a pele.

queratose – Lesão benigna na linhagem de queratinócitos da pele geralmente causada por exposição à radiação ultravioleta.

quimera – Organismo no qual diferentes células ou tecidos derivam de pais geneticamente distintos ou células geneticamente distintas.

quimerização – Processo segundo o qual uma célula doadora introduzida em um embrião hospedeiro é capaz de inserir-se no embrião e participar da formação de alguns dos tecidos emergentes subsequentemente.

quimerizado – (1) Refere-se ao produto protéico de um gene reconstruído no qual duas porções da proteína derivam de duas fontes distintas, especialmente de duas espécies distintas. (2) Uma molécula de anticorpo cuja sequência de aminoácidos da região constante (C) foi substituída por sequências homólogas de outras espécies, por exemplo, uma molécula de anticorpo de um rato na qual a região C é substituída por uma região C humana.

quimiocina – Um mensageiro químico, com freqüência um polipeptídeo, que serve como um atrativo para células móveis, especialmente leucócitos.

quimiotaxia (adj. = **quimiotático**) – Migração direta de uma célula em direção a altas concentrações de um fator atrativo, como, por exemplo, uma quimiocina.

rad – Unidade de radiação correspondente a 0,01 joule de radiação absorvida ou 0,01 *gray*.

radioautografia – *Veja autorradiografia.*

radiossensível – Descreve células ou tecidos que são sensíveis à morte por radiação, incluindo terapias de radiação.

radioterapia – Tratamento de uma doença, principalmente câncer, por meio de irradiação X.

receptor – Proteína encontrada na membrana plasmática ou dentro de uma célula, sendo capaz de ligar especificamente uma molécula de sinalização (seu ligante). A maioria dos tipos de receptores emite sinais, como aqueles que induzem a proliferação celular, em resposta a essa sinalização.

recessivo – (1) Referindo-se a uma das inúmeras características alternativas que podem ser especificadas por um loco gênico; quando o loco é heterozigoto e carrega informação especificando duas características distintas, a característica dominante será exibida pelo organismo, e a recessiva, não. (2) Referindo-se a um alelo de um gene que é incapaz de ditar o fenótipo quando na presença de um segundo alelo que age predominantemente. *Veja também dominante.*

recombinação mitótica – Recombinação entre braços cromossômicos homólogos ocorrendo durante a proliferação de células somáticas, freqüentemente durante a fase G_2 do ciclo celular (em vez da mitose).

reduccionismo – Uma estratégia de pesquisa científica que envolve o estudo de componentes individuais relativamente simples de um sistema complexo, em vez do sistema como um todo.

refratário – Que não responde a algum tipo de sinal ou agente terapêutico.

região homogeneamente corada – Uma região de um cromossomo consistindo em cópias amplificadas de um segmento cromossômico que teve suas extremidades fusionadas.

reincidência – (1) (n.) Recaída para o estado doente, como o ressurgimento de um tumor, após o tratamento com uma terapia ostensivamente bem-sucedida. (2) (v.) Sofrer tal recorrência.

rejeição – Processo pelo qual o sistema imune de um organismo previne o desenvolvimento de células enxertadas, normalmente matando essas células. *Veja rejeição alográfica.*

rejeição alográfica – Situação que ocorre quando um tecido enxertado de um doador é rejeitado pelo sistema imune de um receptor porque doador e receptor, embora membros da mesma espécie, são geneticamente distintos.

rejeição de tumor – Processo pelo qual um organismo previne a formação de um tumor (incluindo formação de tumor por células enxertadas), freqüentemente alcançada por meio da ação do seu sistema imune.

relógio do ciclo celular – Rede de proteínas sinalizadoras do núcleo que regula e orquestra a progressão de uma célula pelo ciclo celular.

remissão – Retirada ou desaparecimento do estado doente, implicando a possibilidade de seu eventual reaparecimento ou agravamento.

renal – Referindo-se ao rins.

reparo de pareamento errôneo – A classe de processos de reparo de DNA que depende do mapeamento de um segmento recém-sintetizado de DNA e da remoção de qualquer base erroneamente incorporada.

reparo por excisão de base – Uma forma de reparo de DNA que inicialmente envolve a clivagem da ligação glicosídica entre uma base e sua desoxirribose por uma enzima de reparo, deixando para trás um nucleotídeo sem a base.

reparo por excisão de nucleotídeos – Um tipo de reparo de DNA no qual o passo inicial envolve a excisão de bases do DNA junto com seus nucleotídeos associados.

repetição *Alu* – Pedaco de uma sequência de cerca de 300 pares de bases que é encontrado em 500 mil a um milhão de cópias espalhadas no genoma humano.

reprimido – Refere-se a um gene que não está sendo expresso e, portanto, não está sendo transcrito.

repressão – Mecanismo regulatório que causa a interrupção da expressão de um gene.

resposta completa – Eliminação de toda a massa tumoral detectada após terapia anticâncer.

resposta imune celular – O braço do sistema imune que depende da habilidade de certos tipos celulares específicos, como, por exemplo, células T citotóxicas, células matadoras naturais e macrófagos, de reconhecer e destruir entidades específicas, incluindo células anormais e agentes infecciosos.

resposta imune adaptativa – Uma resposta do sistema imune que é adquirida ou aprendida após a exposição de um organismo a um antígeno ou agente que carrega antígeno. *Véja também resposta imune inata.*

resposta imune humoral – O braço do sistema imune mediado pelos anticorpos que este produz.

resposta imune inata – Resposta do sistema imune a um antígeno ou um agente que carrega antígeno que ocorre na ausência de exposição prévia do organismo a esse agente ou célula em particular. *Véja também resposta imune adaptativa.*

resposta parcial – Uma redução de 50% ou mais de uma massa tumoral após terapia anticâncer.

ressecção – Remover por excisão cirúrgica.

retículo endoplasmático – Elaborada rede de estruturas membranosas no citoplasma na qual glicoproteínas são formadas.

retinoblastoma – Tumor das células-tronco oligopotentiais da retina.

retrovírus – Classe de vírus que utiliza uma enzima transcriptase reversa para copiar seu RNA genômico em DNA.

ribossomos – Corpos na célula que sintetizam proteínas.

Rituxan – Anticorpo monoclonal quimérico anti-CD20 que carrega um domínio (variável) que combina um antígeno de rato (variável) e um domínio constante humano (*também chamado rituximab*).

sarcoma – Tumor derivado de células mesenquimais, geralmente aquelas que constituem vários tipos celulares de tecido conjuntivo, incluindo fibro-

blastos, osteoblastos, precursores de células endoteliais e condrócitos.

schwannoma – Tumor das células não-neuronais de Schwann, formando camadas ao redor dos axônios neuronais.

secção – uma fatia de um tecido.

segundo mensageiro – Molécula de baixo peso molecular capaz de agir como um hormônio intracelular, conduzindo sinais de uma parte da célula para outra.

segregação – (1) Separação dos cromossomos no final da mitose. (2) Separação dos alelos durante a meiose.

seletividade – Habilidade relativa de uma terapia de afetar células ou tecidos alvejados em comparação com os efeitos (adversos) em células ou tecidos normais. *Véja também índice terapêutico.*

seminoma – Tumor das células germinativas dos testículos.

senescência – Estado de não-crescimento da célula no qual ela apresenta fenótipos celulares distintos e permanece viável por longos períodos, sendo incapaz de proliferar novamente. Com frequência surge após muitas passagens *in vitro*.

serpentina – Refere-se à classe de receptores de proteína G acoplada que se movem para a frente e para trás (padrão tipo serpente) através da membrana plasmática por um total de sete vezes.

sinapse – Conexão física formada entre duas células imunes que interagem, ou entre um linfócito citotóxico e a célula-alvo, que facilita a troca de sinalização entre eles e, no caso de células citotóxicas, a transferência de grânulos citotóxicos da célula tóxica para a célula-alvo.

sincronia – (1) Ocorrendo ao mesmo tempo; ocorrendo de maneira temporalmente coordenada. (2) Refere-se à população de células que entra em uma fase específica do ciclo celular ao mesmo tempo.

sincício – Célula formada quando as membranas plasmáticas de duas ou mais células são fusionadas.

síndrome – Condição de sintomas que, juntos, definem uma condição específica de doença.

síndrome mielodisplásica – Condição hiperproliferativa de células de linhagem mielóide na medula óssea que frequentemente progride para uma leucemia mielogênica aguda.

singênico – (1) Refere-se a dois organismos que compartilham uma bagagem genética idêntica, como dois membros de uma linhagem autocrizada de ratos. (2) Descreve a relação entre dois conjuntos de células ou tecidos derivados de bagagem genética idêntica ou entre um conjunto de células e um organismo.

sensitivo a temperatura – Descreve um fenótipo que é aparente quando células ou vírus crescem em uma temperatura e não em outra.

sinusóide – Canal semelhante a um capilar localizado entre os hepatócitos que se alinha com células endoteliais, não possuindo, porém, células murais ou membrana basal, como um capilar.

splicing – (1) Processo que causa a deleção de um segmento definido de um transcrito de RNA primário e então a fusão dos dois segmentos de RNA que flanqueiam o segmento de RNA deletado. (2) Processo ocorrendo no núcleo por meio do qual um precursor de pré-mRNA é convertido em mRNA mediante a deleção de íntrons e a fusão dos éxons remanescentes.

splicing alternativo – Processo no qual um pré-mRNA pode sofrer *splicing* de diversas maneiras, resultando em mRNAs compostos por diferentes combinações de éxons.

subcutâneo – Abaixo da pele.

sobrevivência livre de evento – Período após tratamento inicial sem que episódios clínicos adicionais da doença sejam registrados.

sobrevivência livre de progressão – Período entre o início de uma terapia antitumor e a subsequente recaída clínica ou piora clara da condição clínica.

soma – Todos os tecidos do corpo com exceção das células germinativas (espermatozóide e óvulo) e dos precursores imediatos das células germinativas.

sonda – Um RNA ou DNA, geralmente radiomarcado, que anela especificamente com o ácido nucleico complementar sendo analisado, permitindo a detecção da sequência de ácido nucleico desejada.

soro – Fluido que permanece quando o sangue coagula.

southern blot – Procedimento no qual moléculas de DNA, geralmente produzidas por clivagem com enzimas de restrição, são verificadas por eletroforeses em gel e transferidas para um filtro ao qual são adsorvidas; o filtro é subsequentemente incubado com uma sequência específica de DNA radiomarcada (sonda), para revelar, por subsequente auto-radiografia, o tamanho dos fragmentos de DNA reconhecidos pela sonda.

submicroscópico – Muito pequeno para ser visto em microscópio ótico.

substrato – Molécula sobre a qual uma enzima age.

superexpressão – Expressão de um RNA ou de uma proteína em níveis maiores do que o normal.

supranumerário – Refere-se ao número maior do que o normal de alguns objetos.

tamoxifeno – Análogo sintético do estrogênio que pode antagonizar certos tipos de ações do estrogênio ligando-se aos receptores deste.

telófase – Quarta subfase da mitose, na qual os cromossomos se descondensam e a membrana nuclear se rearranja.

telomerase – Enzima especializada em estender DNA telomérico; as telomerases conhecidas até hoje carregam uma subunidade de RNA e uma subunidade catalítica tipo transcriptase reversa.

telômero – Estrutura nucleoprotéica protetora na extremidade de um cromossomo eucariótico que protege a extremidade da degradação e de fusão com outros cromossomos.

teratôgeno – Agente que causa malformação por perturbar a morfogênese embrionária.

teratoma – Tumor benigno formado por células-tronco embrionárias no qual uma grande variedade de tipos celulares diferenciados são formados.

tetraplóide – Cariótipo que contém precisamente quatro componentes haplóides (ou dois complementos diplóides) de cromossomos.

tipo selvagem – Alelo de um gene que é comumente presente na grande maioria dos indivíduos de uma espécie.

tolerância – Estado no qual o sistema imune apresenta uma falta de reatividade em relação a certos antígenos, especialmente aqueles que são expressos por células e tecidos normais.

tomografia – Técnica computadorizada de processamento de imagem que integra imagens obtidas por raios X, ultra-som ou outro procedimento de imagem para gerar uma imagem da secção cruzada de um objeto, como o corpo humano, em uma dada profundidade.

topoinibição – *Véja inibição por contato.*

totipotente – Refere-se à habilidade de células-tronco de gerar todas as linhagens celulares diferen-

- ciadas que existem no embrião, bem como as membranas extraembrionárias.
- toxicidade** – Efeito(s) colateral(ais) indesejado(s) de uma droga no tecido e metabolismo normal.
- transcrição reversa** – Reação enzimática na qual uma enzima, como a transcriptase reversa, copia um RNA molde em uma cópia de DNA complementar.
- transcriptase reversa** – Enzima capaz de sintetizar uma cópia do DNA complementar de uma molécula de RNA usando moléculas de RNA como molde.
- transcrição** – Cópia das seqüências de DNA em moléculas de RNA.
- transdiferenciação** – Aquisição por uma célula a partir de uma linhagem diferenciada de uma característica fenotípica celular de outra linhagem, de diferenciação distinta.
- transdução** – (1) Processo no qual um elemento de sinalização, como uma proteína, recebe um sinal e, em resposta, emite outro sinal. (2) Processo pelo qual um gene é introduzido dentro de uma célula, geralmente por um vetor, como um vetor viral.
- transfecção** – Procedimento de introdução de DNA dentro de células de mamíferos, freqüentemente executada pela co-precipitação de fosfato de cálcio.
- transferase** – Enzima que liga uma molécula complexa, como glutatona, ao seu substrato.
- transferência adotiva** – Procedimento no qual as células imunes são transferidas de um doador para um receptor, na esperança de que as células do doador sejam capazes de mediar uma função imune ausente no receptor.
- transformação** – (1) Processo de conversão de uma célula normal em uma célula contendo alguns ou muitos dos atributos de uma célula cancerosa. (2) Alteração de uma célula por meio da introdução de um elemento genético.
- transformante** – Célula transformada.
- transfosforilação** – Fosforilação de uma molécula de proteína por outra, como a fosforilação de uma subunidade do receptor pela cinase carregada por outra.
- transgene** – (1) Gene clonado que foi inserido experimentalmente na linhagem germinativa de um animal. (2) Menos comum, qualquer gene alterado experimentalmente na linhagem germinativa.
- transgênico** – (1) Refere-se a um animal ou prole de animal cuja linhagem germinativa foi experimentalmente alterada, geralmente por meio da inserção de um gene clonado. (2) Menos comum, refere-se a um animal ou prole de animal cuja linhagem germinativa foi alterada por meio de uma ou diversas manipulações genéticas, incluindo a adição de um gene clonado ou a alteração de um gene residente por meio de recombinação homóloga.
- transição** – Mutação de ponto na qual uma base purínica substitui outra ou uma base pirimidínica substitui outra.
- transição epitelial-mesenquimal** – Aquisição por células epiteliais do fenótipo de células mesenquimais, como, por exemplo, fibroblastos.
- transição mesenquimal-epitelial** – O reverso da transição epitelial-mesenquimal. *Comparar com transição epitelial-mesenquimal.*
- tradução** – Síntese de proteína de acordo com a seqüência de bases de moléculas de RNA.
- translocação** – (1) Rearranjo cromossômico que resulta na fusão de dois segmentos de cromossomo que são normalmente ligados um ao outro, freqüentemente resultando em uma alteração microscopicamente visível do cariótipo. (2) Movimento de uma entidade física de uma parte da célula para outra. (3) Movimento de um ribossomo ao longo de um mRNA sendo traduzido.
- translocação recíproca** – Troca de segmentos cromossômicos entre dois cromossomos de pares cromossômicos diferentes, resultando na conservação de todos os segmentos cromossômicos participantes.
- transmembrana** – Refere-se ao domínio de uma proteína que atravessa a membrana e, portanto, existe no ambiente hidrofóbico de uma bicamada lipídica.
- transposon** – Elemento genético ou segmento de DNA que é capaz de se mover de um sítio de integração cromossômico para outro dentro da célula.
- transversão** – Mutação de ponto na qual uma base purínica substitui uma pirimidínica e vice-versa.
- triploide** – Descreve um cariótipo contendo precisamente três complementos haplóides de cromossomos.
- trítio** – Isótopo radiativo de hidrogênio.
- troca angiogênica** – Mudança de uma massa de células tumorais de um estado no qual elas são incapazes de induzir nova vascularização para outro no qual exibem essa habilidade.
- trófico** – Ajudando ou suportando na sobrevivência.
- trombina** – Protease do plasma que é ativada quando encontra dano e desencadeia coagulação sanguínea por ativação de plaquetas e clivagem de fibrinogênio à fibrina.
- tromboembolia** – *Veja embolia.*
- trombopoetina** – Fator de crescimento que estimula a produção de megacariócitos e, portanto, de plaquetas sanguíneas.
- trombopoiese** – Processo que leva à formação de plaquetas sanguíneas.
- trombo** – Um coágulo sanguíneo.
- trópico** – Refere-se a uma tendência de uma célula ou organismo a se mover em direção a ou em direção oposta a algum objeto ou fonte; também à tendência a direcionar suas ações a essa fonte.
- tropismo** – (1) Tendência de uma célula a se encontrar ou se mover na direção de uma localização específica ou fonte de sinalização. (2) Tendência de uma célula a migrar em uma direção específica ou, no caso de câncer metastático, parecer pertencer a algum local de tecido específico no corpo.
- tumor primário** – Tumor que cresce no local anatómico em que iniciou a progressão do tumor e procedeu para formar essa massa.
- tumorocida** – Capaz de matar células cancerosas e/ou destruir um tumor.
- tumorigênico** – (1) Refere-se à habilidade de células de formar tumor quando introduzidas dentro de hospedeiros animais apropriados. (2) Menos comum, pertencendo a um agente como um vírus tumoral que transmite essa habilidade para as células.
- ubiquitilação** – Processo no qual uma ou mais moléculas de ubiquitina são ligadas a uma molécula de substrato protéico, o qual freqüentemente resulta na degradação da proteína ligada à ubiquitina.
- união de extremidades não-homólogas** – Tipo de reparo de DNA que consiste na fusão de duas extremidades de DNA dupla-fita, na qual a junção das duas extremidades não é informada ou direcionada por seqüências na cromátide irmã ou no cromossomo homólogo.
- urotéliu** – Célula epitelial especializada circundando a bexiga.
- vacúolo** – Pequena estrutura, tipo uma bolha, cheia de fluido, freqüentemente observada no citoplasma das células sob estresse fisiológico e em células infectadas por certos vírus.
- vascularizado** – Refere-se à presença de vasos sanguíneos em um tecido, como em um tumor.
- vasculatura** – Rede de vasos sanguíneos.
- vaso ativo** – Refere-se ao regulador de função vascular, como um regulador de permeabilidade ou constrição vascular.
- veículo** – Solvente usado para entregar a droga.
- vênula** – Pequena veia que conduz sangue dos capilares para veias maiores.
- verificação** – Processo no qual uma DNA polimerase rastreia o segmento de desoxirribonucleotídeo que foi recentemente sintetizado com o objetivo de assegurar que a seqüência desse segmento é precisamente complementar àquela da fita molde.
- vetor** – (1) Agente, freqüentemente vírus, que é capaz de carregar um gene de uma célula a outra. (2) Organismo infectado que serve para transmitir e distribuir um agente infeccioso para outros organismos.
- vilo** – Estrutura epitelial tipo um dedo que se desenvolve a partir da parede do intestino delgado para o lúmen.
- vimentina** – Filamento protéico intermediário das células mesenquimais do citoesqueleto, como os fibroblastos.
- viremia** – Presença de altas concentrações de vírus na corrente sanguínea.
- vírión** – Partícula viral que inclui o capsídeo (capa) e o genoma viral.
- virulento** – (De um agente infeccioso como um vírus.) Criando dano, como destruição celular ou de tecido, no organismo ou hospedeiro infectado. *Veja também atenuado.*
- vítiligo** – Disfunção de pele, freqüentemente de origem auto-imune, que leva à perda de melanócitos a partir da epiderme e resulta na perda da pigmentação.
- xenobiótico** – Composto biologicamente ativo que se origina fora do corpo e é estranho para seu metabolismo normal.
- xenoenxerto** – Tecido normal ou neoplásico que deriva de uma espécie que foi colocada dentro de um hospedeiro animal de outras espécies.
- xenotrópico** – Refere-se à classe de retrovírus de uma espécie que pode infectar e replicar a célula de outra espécie.
- zimogênio** – Precursor inativo que forma uma enzima ativa.
- zimograma** – Técnica analítica na qual as taxas de migração de várias proteínas em eletroforese em gel são estimadas por sua atividade enzimática localizada que segue tal eletroforese.

Índice

Observação: referências de páginas seguidas pelos sufixos F, B e T referem-se a Figuras, Barras laterais e Tabelas, respectivamente. Note que onde genes/proteínas humanos e não-humanos homólogos são mencionados no texto, os genes/proteínas são listados utilizando-se a nomenclatura não-humana (p. ex., Ras, em vez de RAS).

A

- abl (oncogene viral homólogo ao da leucemia murina de Abelson) 112, 113F, 468, 758, 758F
proteína de fusão *veja* estrutura da proteína de fusão Bcr-Abl 743F
translocação cromossômica *veja* cromossomo Filadélfia
- Acentuadores 21, 22F
- Acetilação, RNA polimerases I 95
- Ácido 13-*cis*-retinóico (13cRA), pré-malignidade, terapia de lesões na boca/garganta 733
- Ácido araquidônico, síntese de prostaglandinas 448F, 450
- Ácido desoxirribonucleico *veja* DNA
- Ácido retinóico 231-232
- ácido retinóico todo trans (ATRA), terapia para a leucemia promielocítica aguda 732, 733F
- Acromegalia 28
- Actina
associação com E-caderina 603-604
integrinas e 149F
metástase e 625, 625F, 627
transição epitelial-mesenquimal (EMT) 603F, 615
- Actina- α de músculo liso, miofibroblastos 546F
- Adaptabilidade 5
- Adenocarcinoma(s) 30, 31F
colorretal 554F, 699F
gástrico 31F, 529F
pulmonar 736-737, 736T
- Adenoma pedunculado 405F
- Adenomas 28, 37, 38F, 39, 192, 406
alterações genéticas em 422
colorretal 236, 236F, 405F, 406
associação com carcinoma 407, 407F
COX-2 e inflamação 450-451, 450F
perda de heterozigiosidade 409
remoção, taxa de câncer e 407, 407F
polipose adenomatosa familiar (FAP) 236, 236F, 407
tíreóide, produção hormonal pela 28
- Adenomas de mama, variações individuais no metabolismo e 493B
- Adenomas dos vilos 405F
- Adenomas tubulares 405F
- Adenovírus
ações da oncoproteína E1A 275, 275F, 276F, 276B
ações da oncoproteína E1B 95
experimentos de transfecção 97B
imunoevasão 345
indução de câncer 68
interação com a proteína fosfatase 2A 195
prevenção de apoptose 95
proteína E4orf4 195
- Adesão celular
células tumorais 69, 70F, 147
papel da matriz extracelular 147, 149
papel da Ras 188
percepção 149, 186
veja também Integrina(s)
ponto de verificação dependente de ancoragem do ciclo celular 4B
Rho GTPases e 182
sinalização por ErbB 120F
veja também Independência de ancoragem
- Adesões focais 148, 149F, 629
- Adipócitos 31, 530
- Afinidade de ligação, desenvolvimento de drogas 745
- Aflatoxina-B1 (AFB-1)
ativação metabólica pelas Cyps 487-488
carcinoma hepatocelular 444, 487, 488F
como carcinógeno/mutágeno 49
vírus da hepatite B e 444, 487
- Agentes alquilantes 49, 439B, 484-485
como quimioterápicos 523
defeitos MMR e resistência aos 504
desalquilação e 494-496
produtos 485F
- Agentes citotóxicos
como carcinógenos 4755
promoção de tumor e 439-440, 440F, 440B, 475B
- Agentes não-mutagênicos (promotores de tumor) 52B, 54, 435-438, 452T, 453-457, 461, 518
agentes citotóxicos como 439-440, 440F, 440B, 475B
como fenocópias de oncogene 451-452
detecção de (dificuldade) 453, 454
em cânceres humanos 439-441
endógenos 20-21F, 20B, 440, 440F, 440B, 454
indução de câncer de pele em camundongo 435-438, 436F, 437F, 438F, 439F
iniciadores de tumor como 453
locais de ação 452T
papel da inflamação 441-444, 442F, 442B, 443F, 444B, 454-457, 482B
mecanismo 451, 451F
veja também Inflamação; vias específicas de agentes mitogênicos 440-441, 441F
vias de sinalização 444-452, 451F
proliferação celular e 438, 440B
taxa de progressão e 452-453
veja também agentes específicos
- Agentes promotores *veja* Agentes não-mutagênicos (promotores de tumor)
- Agentes químicos causadores de câncer *veja* Carcinógenos
- Agentes químicos eletrofílicos 484
- AIDS *veja* infecção por HIV /AIDS
- Alças T 373, 373F
- Álcool (etanol), como promotor de tumor 439, 475B
- Alelo(s) 4
deleção *veja* perda de heterozigiosidade (LOH)
evolução 4-5
variação (polimorfismo) *veja* Polimorfismo
veja também Mutações (ões)
- Alelos nulos 221, 312
- Alelos tipo selvagem 4
- Alimentos *veja* Dieta, Mutágenos/carcinógenos na alquiltransferase do DNA 494-495, 495F
quimioterapia e 523
- Alterações pré-malignas 36-39, 37F, 38F
- Erosão telomérica 389, 389F, 392
- Esôfago de Barrett 37
- Lesões na boca/garganta 733
veja também Displasia; Hiperplasia; Metaplasia
- Alvos protéicos potenciais para o desenvolvimento de drogas, terapia do câncer 793
- Ames, Bruce 49, 50
- Aminas heterocíclicas (HCAs) 488-490, 489F
- Câncer colorretal e 22B
- Flora colônica e 22B
- Variações individuais 493B
- Aminoácidos 15
- 2-amino-1-metil-6-fenilimidazo[4,5-b]piridina (PhIP) 488, 489F
- Amplicon 1025, 108
- Amplificação gênica 13B, 100, 116
amplicon 102B, 108
Ciclina D1 298, 298F
co-amplificação 102B
genes *myc* 100, 107, 107F, 107B, 108, 116, 349
HER2/neu 100-101, 101F, 102F, 102B, 116, 156
regiões cromossômicas comuns 108T
sem superexpressão gênica 111B
superexpressão do receptor de fator de crescimento 132B
- Anáfase 258, 258F
- Análise de árvore genealógica 237F, 237B
- Análise de ligação 237F, 237B
- Análise de urina, dano oxidativo ao DNA 483B
- Análise do número de cópias
FISH 421, 422F
hibridização genômica comparativa 422-423, 422F, 423F
- Análise por microarranjo *veja* Arranjos de expressão gênica
- Aneuploidia 12F, 12B, 397F, 510, 511-517, 525
como causa vs. consequência 512
definição 11
mecanismos 392-393
defeitos moleculares 514-515
segregação mitótica errônea 512-513
veja também Instabilidade cromossômica (CIN)
- Angiogênese 556-580
angiogenina 560, 567T
angiopoetina 560, 561-562, 567T
células em construção 534-535, 560
células endoteliais *veja* Células endoteliais
células precursoras endoteliais 570, 582
modelos animais 570-571, 570F
cura de ferimentos 539
desenvolvimento embrionário 556-557
estágio invasivo 568-569, 568F
fator de crescimento de fibroblastos ácido 567T
fator de crescimento de fibroblastos básico 559-560, 567T
fator de crescimento de hepatócito 567T
fator de crescimento derivado de plaquetas 567T
fator de crescimento placentário 567T
fator de crescimento transformante α 567T
fator de crescimento transformante β 559-560, 567T
fator de crescimento vascular endotelial *veja* Fator de crescimento vascular endotelial (VEGF)
fator de necrose tumoral α 567T
fator de transcrição HIF-1 e 244F, 245
fator estimulador de colônia de granulócito 567T
fatores importantes 567T
heterogeneidade 569, 569F
hipoxia 563
iniciação, imunologia tumoral 684
integridade da membrana basal 567-568, 568F
interleucina-8 560, 567T
leptina 567T

- macrófagos associados a tumor (TAMs) 552-553, 554F, 555-556
- malignidade vs. 569, 569F
- metástase 591, 632
- micrometástases 646
- miofibroblastos 558
- recrutamento 568F
- modelo de camundongo transgênico Rip-Tag *veja* Modelo de camundongo transgênico Rip-Tag
- modelos animais de enxertos 559-560, 561F
- pericitos 532
- prevenção pela p53 332
- proliferina 567T
- supressão/inibição 571-574, 572T, 575F
- angiostatina 572-573, 572T, 574
- arrestina 572T, 574
- como terapia *veja* Terapias antiangiogênicas
- efeitos na cura de ferimentos 547
- endostatina 572T, 573-574
- expressão do receptor Fas 571, 573F
- inibidores teciduais de metaloproteínas 572T, 574, 574B
- interrupção do fator-1 induzida por hipóxia 571
- triptofanil-tRNA sintetase 572T, 574B
- trombospondina-1 571-572, 572T
- tumstatina 572T, 574
- troca angiogênica *veja* Troca angiogênica *veja também* fatores específicos afetando
- Angiogenina 560, 567T
- Angiopietina-1 532, 560, 561-562, 567T
- Angiossarcoma 31-32
- Angiostatina
- modelo de camundongo transgênico Rip-Tag 576
- supressão da angiogênese 572-573, 572T, 574
- supressão de metástases 573-574
- terapias antiangiogênicas 576
- Animais experimentais 3
- Animais *knock-in*
- construção 250B
- superexpressão de p53 e envelhecimento 5F, 5B
- Animais *knock-out*
- BRCA1/BRCA2 505-506
- camundongo *mTR* (mTR)
- diferenças generacionais 387-388, 387F, 390
- susceptibilidade ao câncer 388-391, 391F
- ciclinas 303B
- construção 250B
- fator de transcrição E2F 6B
- gene *mdr* 446, 447F
- gene *p16^{ink4A}* 390
- gene *p53* 310
- gene *p63* 8B
- gene *p73* 8B
- gene *p16^{Ad}* 390
- gene *Rb* 249, 252F
- genes supressores de tumor 249, 250-251F
- integrinas 150B
- knock-outs* TNF- α 446
- maquinaria apoptótica 329
- praticar 673-674
- proteína Mdm2 323B
- RAG-1/RAG-2 674-675, 676F
- VEGF 566-567
- Animais transgênicos
- experimentos com o relógio do ciclo celular 303B
- experimentos de transformação
- mutações colaborativas e 429-430, 431F
- mutações únicas e 426, 426F
- expressão de myc em hepatócitos 296
- identificação de genes supressores de tumor 249
- mutações em células-tronco 469
- produção 250-251F, 250B
- superexpressão da p53 e envelhecimento 5F, 5B
- suscetíveis a câncer 430
- veja também* Animais *Knock-in*; Animais *Knock-out*
- Anoikis 147, 188, 188F, 334, 334F, 532, 65B
- dependência de ancoragem e 45
- metástase 592
- Anormalidades cromossômicas 10-11, 12-13F, 12-135, 49, 397F, 510-511, 524-525
- amplificação 108T
- veja também* Amplificação gênica
- análise da mutagenicidade 52B
- ciclos de quebra-fusão-ponte (BFB) 372, 372F, 391, 392F, 511
- cromossomo Filadélfia *veja* Cromossomo filadélfia
- defeitos estruturais 510-511
- defeitos na ploidia (numérica) *veja* Aneuploidia
- defeitos no reparo de DNA 506, 507F, 508, 519
- diversificação clonal e 421-423, 421F, 422F, 423F
- estudos de gêmeos 426F, 427, 427B
- malignidade hematopoiética 513B
- mutações em *BRCA2* 506, 50Th, 508
- prova de monoclonalidade 41-42, 42F
- recorrente 511
- veja também* Cariótipo; *anormalidades específicas*
- Anoxia, apoptose 329
- Anticorpo anti-fator de crescimento endotelial vascular 790
- terapia antiangiogênese 577, 578T
- terapia para metástases de carcinoma de cólon 577
- vasculatura tumoral e 265, 27F
- Anticorpo anti-HFR2/Neu 607F
- Anticorpo anti-receptor do estrogênio 607F
- Anticorpo antivimentina, histopatologia EMT 607, 609
- Anticorpos 656-567, 659-663, 670F
- antitumor 679
- estrutura 657F
- expressão em mieloma 41
- hipermutação somática 225
- humanização 705, 705F
- ligação a células infectadas 656-657
- ligação ao antígeno 225, 656, 657F
- ligação ao patógeno 656, 657F
- mudança de classe 225, 509B
- neutralização de partículas 661
- produção 661
- promotores, translocações cromossômicas 109F, 110
- quimerizado 705
- RAG-1/RAG-2 674
- reconhecimento de antígenos de transplantação associados a tumor (TATAs) 690
- reconhecimento de antígenos de transplantação tumor-específicos (TSTAs) 690
- veja também* Antígeno(s); *anticorpos específicos*
- Anticorpos anti-CD20 710-711, 711F
- veja também* Rituxan
- Anticorpos anticitoqueratina 596, 596F
- Anticorpos anti-CTLA4 716-717, 716-71 7F
- Anticorpos antimolécula de adesão de células epiteliais (EpCAM) 596, 596F
- Anticorpos anti-receptor do fator d crescimento endotelial vascular 577, 578T
- Anticorpos anti-receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas 577-578
- Anticorpos anti-receptor do fator de crescimento epidérmico
- câncer de cólon 752, 753F
- Gleevec vs. 759, 760T
- Iressa vs. 766
- Tarceva vs. 766
- Anticorpos anti-Src 124, 124F, 125F, 125B
- Anticorpos antitumor, imunologia tumoral 679
- Anticorpos humanizados 705, 705F
- Anticorpos MDX-010 716-717F, 717
- Anticorpos quimerizados, definição 705
- Antiestrogênio 199B
- veja também* agentes específicos
- Antígeno CD24, tumorigenicidade e 417F
- Antígeno CD25, células T regulatórias (T_{reg}) 669
- Antígeno CD3, ligação da Herceptina 405
- Antígeno CD4, células T regulatórias (T_{reg}) 669
- Antígeno CD44, tumorigenicidade e 417F
- Antígeno Hu, síndromes paraneoplásicas 375
- Antígeno large T *veja* antígeno(s) 1
- Antígeno middle T *veja* Antígeno(s) T
- Antígeno nuclear de célula de proliferação (PCNA) 505
- Antígeno Yo, síndromes paraneoplásicas 37F
- Antígeno(s) 656
- ligação ao anticorpo 22B, 656, 657F
- processamento 660T, 661F, 663
- redução da expressão 690-691
- tecidos imunoprivilegiados 662
- variação 672, 720
- veja também* antígenos específicos
- Antígeno(s) T
- interações com a proteína fosfatase 2A 19B
- large 9B, 308, 427
- ações 18B
- expressão 70-71, 71F
- imortalização e 366F, 367, 432
- interações com a p53 308, 308F, 309F
- interações com a proteína Rb/bolso 275, 276F, 276B
- prevenção da senescência 366F, 367
- middle 185, 427
- small 19B
- Antígenos de câncer de testículos 688-689
- Antígenos de diferenciação 688, 691
- Antígenos de transplantação associados a tumor (TA-TAs) 655-686, 687-689, 723
- antígenos de diferenciação 688, 691
- antígenos oncofetais 688-689, 688F
- definição 685-686
- experimentos de transplantação de tumor 673F, 686
- ligação a células T citotóxicas 690
- ligação de células T auxiliares 690
- melanomas 39F, 39B, 687-688
- quebra de tolerância 689
- reconhecimento de anticorpos 690
- redução da expressão 690-691
- Antígenos de transplantação tumor-específicos (TS-TAs) 685-687, 685T
- antígenos de diferenciação 691
- definição 685
- experimentos de transplantação de tumor 673F, 686
- expressão alta vs. baixa 686-687
- fisicamente induzidos 38B
- induzidos por vírus 687
- instabilidade de microssatélites 687B
- quimicamente induzidos 38B, 656, 686F, 687
- reconhecimento de anticorpos 690
- redução da expressão 690-691
- Antígenos de transplantação tumor-específicos (TS-TAs) induzidos por vírus 687
- Antígenos internos, apresentação de antígeno 663-664, 664F
- Antígenos novos, imunologia tumoral 720
- Antígenos oncofetais *veja* Antígenos de transplantação associados a tumor (TATAs)
- APE (endonuclease apurínica/apirimídica) 496
- Apoptose 302, 307-356, 334-342146F, 355
- “roda da morte” 340, 340F
- anoikis* 147, 188, 188F, 334, 334F
- apoptossoma 340, 340F, 341F
- Bcl-2 e proteínas relacionadas 334-335, 335F, 336-340, 338F, 339F, 345, 355
- casca da caspase 340-342, 341 F, 345F, 355 “substratos da morte 341 F, 342
- circuito de sinalização 354F
- citocromo C 336-337, 337F, 340-341, 341F, 355
- como alvo terapêutico 425
- como risco para as células cancerosas 332
- convergência de vias 345F
- crise celular e 364, 368, 368F
- deteção de
- coração com anexina V 7F 75
- ensaio TUNEL 71f 75, 331F
- disparo 329, 339
- extrínseca (mediada por receptor) 343-345, 344F, 345F, 349, 355
- veja também* Receptores de morte
- indução de E2F 65, 323-324, 324F, 342, 352
- indução de Myc 325, 334-335, 349, 352
- induzida por raios X 471

- inibidores da apoptose (IAPs) 340, 341, 341F, 701
intrínsecos (p53/mediada por estresse) 322F, 323-325, 329-331, 334, 342-343, 345F
ciclos BFB e 390
genes-alvo da p53 327T, 331
modelo de camundongo transgênico Rip-Tag 564
p53 8B
p73 8B
veja também ARF; proteína p53
vias de sinalização 346F
- mudanças celulares devido a 329, 330F, 336T
na síndrome de Kostmann 440F, 440S
necrose vs. 335, 336T
papel na fisiologia tecidual 329-330
enterócitos 238F, 239
eritropoiese 329-330
invólucro mamária 330
ligação a células e 147
papel no desenvolvimento 329, 331F, 335, 358F
prevenção/proteção de
balanço protéico pro e antiapoptótico 338-339, 339F, 352-353
em células cancerosas 346-350, 348T, 349F, 352, 355, 458
fator de crescimento Slug 617
fator de crescimento Twist 617
receptor HER2/Neu 707
resistência a drogas e 756
veja também Mecanismos anti-apoptóticos
- reciclagem de células 331
sinalização com ErbB 120F
terapia do câncer e 353-354
veja também componentes específicos
- Apoptose extrínseca 343-345
Apoptose intrínseca 342-343
Apoptossoma 340, 340F, 341F
Apresentação de antígeno 659-661, 660F
acentuamento *veja* Imunoterapia
antígenos internos 663-664, 664F
células dendríticas (DCs) 659-660, 660F
células T auxiliares (TN cells) 660-661, 661, 662F
complexo maior de histocompatibilidade maior 659-660, 660F, 661F
classe I 661 F
classe II 660-661, 661F
intercelular, MHC de classe I 663-664, 664F
linfonodos 662F
“área sob a curva”, farmacocinética 750
- ARF
antagonismo de Mdm2 e regulação da p53 321-323
camundongo *veja* gene/proteína p19^{arf} (ARF de camundongo)
como supressor de tumor 323
humano *veja* gene/proteína p14^{arf} (ARF humana)
mutação/perda em células cancerosas 324, 332, 347
como alternativa à mutação na p53 65
mecanismos 65
papel na apoptose mediada por p53 322F, 323-325
regulação 323
splicing alternativo de p16^{ink4A} 321 F
- Arranjos de expressão gênica 20F
amplificação do gene *HER2/neu* 102F
Classificação de linfomas de células B 730, 731F
diagnóstico 728-729, 731
miofibroblastos 549F
transição epitelial-mesenquimal *veja* Transição epitelial-mesenquimal (EMT)
- Arranjos para captura de microdissecção a *laser* 731
Arrestina, supressão da angiogênese 572T, 574
Ascitos 25F 255, 32F 325
Aspirina, prevenção/proteção ao câncer 445
Astrocitoma(s) 35F, 588, 786-787
Astrócitos 35F
Atalhos arteriovenosos, metástases 594
Atalhos peritoneovenosos, metástase e 32F, 32B
Ataque imune 692, 693, 700
Ativação de células matadoras naturais (NKs), 667-668, 670F, 695-697, 722
camundongo *nu* 672
- citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) 657, 657F
embolização e metástase 28-29F, 28B
expressão de MHC de classe I 694, 696
imunologia tumoral 685
ligação de proteína de estresse 695-696, 696F
mecanismos de assassinato 666-667F, 667
NKG2D 695-696, 696F
produção de interferon- γ 667-668, 673
receptor inibidor de matadora (KIR) 695, 695F
reconhecimento de MHC de classe I 695, 695F, 696
resposta imune inata 659
- Ativação de sinal pró-apoptótico, terapia do câncer 733-734
veja também Apoptose
- Ativador urocinase de plasminogênio (uPA) 546, 623-624, 624F
- Autofagia 353, 353F
- Autofosforilação
EGF-R 136F, 157
Src 124
veja também Transfosforilação
- Auto-radiografia 467F, 472-473F, 473-474
- Autossomos 9
- Avastina *veja* Anticorpos anti-receptor do fator de crescimento epidermal
- Axina, complexo multiprotéico da β -catenina 189-190
- B**
- Bacilo Calmette-Gubrin (BCG), imunoterapia 715F, 715B
- BAGE, antígenos de transplantação associados a tumor (TATAs) 689
- Baltimore, David 63F, 74
- Base(s) de DNA
alquilação 484-485, 494-495, 495F
dano oxidativo 482, 483F
formação de adutos 485, 486F, 493-499
fotoprodutos do UV 484, 485F
metilação 494-495, 495F
substituições 439B, 484
- Bases citosina
efeitos do bissulfito de sódio 3F, 35
formação de dímeros 484, 485F
- Bases guanina, oxidação 482, 483F
- Bases pirimídicas
ataque por espécies reativas de oxigênio 482, 483F
fotoprodutos 23B, 484, 485F
veja também Bases citosina; Bases timina
- Bases púricas
ataque por espécies reativas de oxigênio 482, 483F
fotoprodutos 484, 485F
- Bases timina
formação de dímeros 484
produtos de oxidação 482, 483F
- BAY12-9566, terapia antiangiogênese 578T
- Bcl-w, inibidores 739, 740-741F
- Bcl-X_L 335F, 337, 338F, 350B
inibidores 739, 740-741F
Interações com a proteína BH-3, como alvo terapêutico 739, 740-741F
- bcr* (região de quebra de grupamento) 112, 113F, 468, 758, 758F
proteína de fusão *veja* Proteína de fusão Bcr-Abl
translocação cromossômica *veja* Cromossomo Filadélfia
- Beclina-1 353
- Benzo[a]pireno 480, 485, 486F, 487, 490
- Benzo[a]pirenodióxido (BPDE) 486F
- β_2 -microglobulina, imunoevasão e 691-693, 694F
- β -catenina 145-146, 206
citossólica 189
complexo multiprotéico (Apc e axina) 189-190, 238F, 239, 240F
inativação de Apc e 239-241
- veja também* Regulação do gene/proteína *Apc* 190F
- degradação, papel de p53 328
- estrutura 205F
- expressão em células cancerosas 190-191
- interações com CBP, como alvo terapêutico 740-741 F
- ligação à molécula de adesão 189, 190
- ligação ao fator de transcrição Tcf/Lef 189, 190, 238F
- papéis funcionais 189F, 238-239, 238F, 284
- transição epitelial-mesenquimal e 602F, 605-606, 606F
veja também Sinalização Wnt
- β -galactosidase ácida, marcador de senescência celular 367, 367F
- Bevacizumab *veja* Anticorpo anti-fator de crescimento endotelial vascular
- Bibliotecas genômicas 23
veja também Clones/clonagem
- Bicamada lipídica 178F
- Bioinformática, estratificação do câncer 729
- Biomarcadores 55
diagnóstico do câncer 727
senescência celular 12-13f 12B, 367, 367F
- Bisfosfonatos 640-641, 6435
- BMS275291, terapia antiangiogênese 578T
- Bomba multidrogas de efluxo, resistência a drogas 756, 757F
- Bombas de drogas 471, 756, 757F
- Bortezomib *veja* Velcade
- BRMS1*, genes supressores de metástase 643T, 644
- Bromodeoxiuridina (BrdU), reativação do retrovírus endógeno 92
- C**
- Cadeia transportadora de elétrons 342
veja também Espécies reativas de oxigênio (ROS)
- Caenorhabditis elegans*, linhagens celulares 358F
- Caixas E 285
- Camadas celulares embrionárias 30, 30F
- Camundongo
cepas imunocomprometidas 35B
cepas intercruzadas 35B
como modelos de câncer humano 35B, 429-430, 457-458
genoma, humano vs. 431
imortalização de células 431
indução de câncer de pele 466
genes/proteínas envolvidos 437-438, 438F
iniciadores/promotores 435-436, 436F, 437F, 467
susceptibilidade a câncer 388
telômeros/telomerase 386-388, 386B, 432
knock-outs, diferenças generacionais 387-388, 387F
transformação por DNA tumoral humano 93-98, 96F, 98F
transgênico *veja* Animais transgênicos
- Camundongos (laboratório) *veja* Camundongo
- Camundongos *knock-out mTR* (*mTR*^{-/-})
deficiência em supressor de tumor 390
diferenças generacionais 387-388, 387F, 390
susceptibilidade ao câncer 388-391, 391F
ciclos BFB e 390-391, 392F
relação com a tumorigênese humana 392-393
tipo de tumor 390, 393
- Camundongos *nu* 70-71, 71F, 672
- Câncer cervical
fusos mitóticos multipolares 515F
metilação do DNA 230F
papilomavírus humano e 9F 9B, 18B, 73, 455
desenvolvimento de vacinas 726-727
progressão de múltiplas etapas 406F
receptores de órgãos transplantados 680T, 680t
sinalização Notch 196
sinalização por NF- κ B 195F
- Câncer colorretal

- adenocarcinoma
 imunoevasão 699F
 metaloproteinases de matriz 554F
 cancerização de campo 412-413
 carcinógenos 225, 415-416, 415B
 carcinoma invasivo 405F
 células do estroma 529F
 efeito em tecido normal 588
 em receptores de transplantes de órgãos 680T
 fator de crescimento derivado de plaquetas 544
 fatores da dieta 22B, 415-416, 415B
 HNPCC 416, 501-502, 521
 imunoevasão, síntese da β_2 -microglobulina 694F
 incidência
 polipectomia e 407, 407F
 predição 402-403
 instabilidade cromossômica (CIN) 512, 513F, 521
 instabilidade de microssatélite 292, 512, 513F, 687B
 mecanismos de defesa 238F, 239, 413
 metástases 588
 células do estroma 536F
 especificidade de tecido 635
 fígado 405F, 636
 terapia com anticorpos anti-VEGF 577
 micrometástases 645
 monócitos 530F
 mortalidade 726, 726F
 mutações/alterações moleculares 241, 411F
 acumulação de 408-412, 410F
 alterações epigenéticas 408, 412
 expressão de COX-2 450F
 genes de reparo de pareamento errôneo 416
 instabilidade genômica 292, 512, 513F, 521, 687B
K-ras 409 409F
 metilação do promotor de *MGMT* 494
 mutações src 101
 perda de *APC* veja gene/proteína *Apc*
 perda de heterozigotidade 223, 223F, 409, 409F, 411
 repressão de *KAI1/CD82* 644
 sucessão de 410
 supressores de tumor 409, 409F, 644
 polipose adenomatosa familiar e 236, 236F, 407, 412-413
 prevenção por NSAIDs 445
 progressão tumoral múltiplas etapas
 alterações histopatológicas 404-407, 405F
 dieta e 225, 415-416, 415B
 FAP e cancerização de campo 412-413
 insultos genéticos acumulados 408-412, 410F
 papel da inflamação 442, 442F, 442B, 446, 450-451, 450F
 veja também mutações/alterações moleculares
 vias alternativas 411F
 seqüência adenoma-carcinoma 406-407, 406F, 407F, 501
 tratamento anti-EGF 753F
 tratamento com o receptor anti-EGE 455, 752, 753F
- Câncer de bexiga
 cancerização de campo e progressão tumoral múltiplas etapas 16-17B, 16F-17F
 genes/proteínas do ciclo celular 297T
 metaloproteinase-9 (MMP-9) da matriz 555
 mutações na H-ras 105-106, 105F
 receptores de transplantes de órgãos 680T
 RhoGDI-2 644
 sacarina e 456B
- Câncer de cabeça e pescoço
 genes/proteínas do ciclo celular 297T
 progressão múltiplas etapas 406F
 promotores de tumor citotóxicos 439-440
 veja também tipos específicos
- Câncer de mama
 alterações de EGF-R 111
 análise genômica comparativa 423F
 angiogênese, integridade da membrana basal 568F
 benzo[a]pireno e 490
 cancerização de campo 16-175, 16F
 células de estroma 532
 células-tronco tumorais 335
 citometria de fluxo 417-418
 comportamento reprodutível e 20-21F, 205, 46
 diagnóstico 728, 729, 729F
 em receptores de transplantes de órgãos 680T
 estrogênio e mitogênese 199B, 440-441
 papel da ciclina D 267B
 expressão de COX-2 448-449, 450F
 fator de transcrição Slug 616
 fator de transcrição Snail 616
 fatores genéticos 245
 genes/proteínas do ciclo celular 297T
 gravidez e risco 20-21F, 205
 incidência, mortalidade vs. 728, 728F
 integrina(s) e 150F
 macrófagos associados ao tumor (TAMs) 554F, 555-556
 metástases 588, 589F
 células do estroma 536F
 cérebro 588
 invasão 592F
 linfonodos 632, 633F
 osso 638, 639-640, 641 F
 tropismo para o pulmão 636
 metilação do DNA e 230F
 micrometástases 645
 mitógenos e 440-441, 441F
 modelo do camundongo transgênico 430
 mortalidade 726F
 incidência vs. 728, 728F
 triagem vs. efeitos terapêuticos 405
 níveis de ciclina F e progressão 303-304, 303F
 prevenção pelas NSAIDs 445
 produção de VEGF 554F
 prognóstico e 569, 569F
 prognóstico 569, 569F, 729, 780F
 progressão
 localização de p27^{Kip1} e 271, 271F
 múltiplas etapas 406F, 408
 reparo de DNA e 24F, 24B
CHK2 245
 mutações *BRCA1/BRCA2* 235, 24F, 245, 505, 509, 522
 secreção do fator de crescimento derivado de plaquetas 544
 sinalização com NF- κ B 195F
 sinalização Wnt 190
 síndrome de Li-Fraumeni 333F
 superexpressão de HER2/Neu 100-101, 101F, 102F, 102B, 683, 705
 prognóstico e 569, 569F
 superexpressão de Stat3 186
 telômeros em 389F
 transição epitelial-mesenquimal (EMT) 607F
 tratamento
 ciclofosfamida e desenvolvimento de leucemia 728
 cirurgia e estimulação do crescimento 548B
 Herceptina veja Herceptina
 importância do subtipo 787
 resistência à droga 755
 veja também tipos específicos
 vírus de tumor mamário de camundongo (MMTV) 65, 885
- "Câncer de origem desconhecida" (CUP), metástase 648-649
- Câncer de pele
 cancerização de campo 16, 16F, 17F, 17B
 cor da pele e 491
 fatores ocupacionais 45
 indução experimental em camundongos 435, 436F, 466
 agentes não-mutagênicos (promotores de tumor) e 435-437, 436F, 437F
 efeitos de 5-FU 467-468
 genes/proteínas envolvidos 437-438, 438F
 mecanismo 437F
 mutações em células-tronco de queratinócito 469
 p53 e 318B
 receptores de transplantes de órgãos 680T
- sinalização *Hedgehog* 195F
 veja também tipos específicos
 xeroderma pigmentoso e 499, 499F
- Câncer de próstata
 adenocarcinoma 558F
 aminas heterocíclicas e 490
 angiogênese, integridade da membrana basal 568F
 genes/proteínas do ciclo celular 297T
 incidência 41F, 41B
 mortalidade vs. 728
 metástases 588
 especificidade ao osso 635
KAI1/CD82 e 644
 osso osteoblástico 638
 miofibroblastos 546F
 mutações na glutatona-S transferase 492F
 perturbação na via *Hedgehog* 780
 progressão de tumor múltiplas etapas 406F, 408
 receptores de transplantes de órgãos 680T
 secreção do fator de crescimento derivado de plaquetas 544
 sinalização Notched 195F
 suprimento de sangue 557F
 tratamento, agressivo vs. espera cuidadosa 41B
 triagem 41B
- Câncer de pulmão de células não-pequenas (NSCLC)
 células T 530F
 estratificação de paciente 768
 hipermetilação 231
 Iressa terapia 767-768, 769F
 linfócitos infiltradores de tumor (TILs) 680F
 macrófagos associados a tumor 554F
 receptor EGF 768
 tratamento anti-EGF-R 45B
- Câncer de pulmão
 adenocarcinomas, modelos animais 736-737, 736T
 fatores ocupacionais 46
 genes/proteínas do ciclo celular 297T
KAI1/CD82 e 644
 Linha de tempo 400, 401F
 metástase de câncer de mama 636
 mortalidade 40B, 726, 726F
 mutações na p53 487F, 490
 polimorfismos na p53 e resposta à terapia 42F, 42B
 prevenção por NSAIDs 445
 relacionado ao fumo 34, 46, 400, 401F
 mutações na p53 487F
 passo final na tumorigênese 424B
 progressão múltiplas etapas 406F, 408
 veja também Fumo; tabaco
 secreção de fator de crescimento derivado de plaquetas 544
 sinalização Notch 196
 síndrome de Li-Fraumeni 333F
 transplantes de órgãos e 679, 680T
 veja também tipos específicos
- Câncer de tireóide
 metástases, linfonodos 634
 mutações *ret* 142B
 receptores de transplantes de órgãos 680T
 sinalização pela proteína G e 192
- Câncer gástrico
 adenocarcinoma 31F, 529F
 alterações no EGF-R 111
 etiologia infecciosa 60-61, 115
 familiar, mutação na *COH1* 604
 fator de transcrição Sipl 616-617, 617F
 fator de transcrição Twist 616
 incidência/mortalidade 40B, 726F
KAI1/CD82 644
 progressão múltiplas etapas 408
 variação geográfica 44
- Câncer hereditário de cólon sem polipose (HNPCC) 416, 501-502, 521
- Câncer hereditário nas papilas renais, mutações met 142B
- Câncer nasal, uso do tabaco e 45
- Câncer no fígado
 carcinoma hepatocelular (hepatoma) veja Carcinoma hepatocelular (HCC)

- efeito em tecidos normais 588
incidência, variação geográfica 444B
metástases do câncer de cólon 405F, 636
superexpressão de hIERT 683
- Câncer oral 515F, 680T, 699F
- Câncer ovariano
genes/proteínas do ciclo celular 297T
macrófagos associados a tumor (TAMs) 555
mortalidade 726F
mutações em BRCA1/BRCA2 505, 509
resistência a drogas 755
terapia, anticorpos anti-CTLA4 717
- Câncer pancreático
ciclos BFB e tumorigênese 393
efeito em tecidos normais 588
fator de crescimento transformante β (TGF- β) 195F
gemcitabina 754, 755F
genes/proteínas do ciclo celular 297T
KA1/CD82 644
metástases 589F
mortalidade 726F
oncogenes K-ras, perfil de expressão 736
perturbação da via Hedgehog 780-781
desenvolvimento de drogas 782
prevenção por NSAIDs 445
progressão múltiplas etapas 408
síndrome de Li-Fraumeni 333F
- Câncer uterino, mortalidade 726F
- Câncer
“velocidade basal” 43
como doença transmissível 355, 58, 87
veja também Vírus de tumor
diagnóstico *veja* Diagnóstico do câncer
incidência *veja* Incidência de câncer, “inevitabilidade” 402
ligação com obesidade 10F, 10B
mortalidade *veja* Taxas de mortalidade
natureza do 25-56
passagem de tempo 400-403
patogênese
diferenciação celular e 292
papel da proteína G 152B
proteínas Id 295, 300
receptores comumente envolvidos 129T, 133T
STATs 186, 186F
processo do *veja* Carcinogênese; Tumorigênese
proteção/prevenção
drogas antiinflamatórias 445
veja também drogas antiinflamatórias não-esteroidais (NSAIDs)
efeitos da varredura do câncer 40B
risco do *veja* Risco de câncer
tecido normal vs. 26F
tratamento *veja* Terapia do câncer
veja também Célula(s) de câncer; Tumor(s); malignidades específicas
- Cânceres de pulmão de células não-pequenas (SCLCs) 34
fenótipo neurosecretor 34, 192
resistência a drogas 755
sinalização autócrina 133-134
sinalização pela proteína G 192
síndromes paraneoplásicas 37F, 37B
supressão da expressão de MHC de classe I 693, 693B
tabagismo e 34
- Cânceres de rim
carcinomas de célula limpa, doença de Von Hippel-Lindau 241
receptores de transplante de órgãos 680
- Cânceres de segundo local, efeitos colaterais da terapia do câncer 728
- Cânceres epiteliais 29, 30, 31F, 55
crescimentos pré-malignos 37, 39
incidência relacionada à idade/tempo percorrido 400-401, 400F, 402F
promotores/iniciadores de tumor 439
papel de COX-2 449-450, 451F
veja também Inflamação
- tipos celulares 528, 529F, 530, 530F
veja também Carcinoma(s); Estroma tumoral; *cânceres específicos*
- Cânceres gastrintestinais
genes/proteínas do ciclo celular 297T
veja também tipos/localizações específicos
- Cânceres ocupacionais 45-46, 494B
- Capacidade replicativa 301-302
células em cultura 35BF, 359-360
células-tronco embrionárias 360
crise celular e 364, 368, 365F
estresse fisiológico e 364, 365-367, 365F, 366F
linhagem(ns) celular(es) 359-360, 359F
número imitado 363-364
“relógio generacional” 364, 368
telômeros e 368-372
veja também Telomerase; Telômero(s)
veja também Proliferação celular; Senescência celular; Imortalização
- Capilares associados a tumor *veja* Capilares
- Capilares *Bypass*, metástase 594
- Capilares
associados a tumor
organização 560-562, 562F
vazamento 560-561, 562-563, 563B
pericitos 560, 562F
permeabilidade, VEGF e 563B
- Caquexia, inibidores do proteossoma 772
- Carcinogênese
como processo multipassos 36, 54
indução química 46-48
indução viral 48, 55
veja também Vírus tumorais
mutação *veja* Mutação(s)
pele, modelo em camundongo 435-438, 436F, 437F, 438F
veja também Carcinógenos; Tumorigênese
- Carcinógeno terminal 50, 485, 486F, 487
- Carcinógenos completos 453, 475B
- Carcinógenos não-genotóxicos *veja* Agentes não-mutagênicos (promotores de tumor)
- Carcinógenos
ativação de proto-oncogenes 97-98, 105-106
ativação de retrovírus endógeno 93
como agentes citotóxicos 475B
como mutágenos 48-52, 54, 93, 435
iniciação tumoral 439B
na fumaça do cigarro 439
completos 453, 4755
duração vs. tempo de exposição 403, 403F
epidemiologia da exposição 403, 403F
físicos (radiação) 46, 48, 56, 92, 484
formação de adutos de DNA 485, 486F
metabolismo dos 50, 53, 485-490, 524
Cyps e 485, 486F
flora colônica 22B
variações individuais 493B
não-mutagênico *veja* Agentes não-mutagênicos (promotores de tumor)
oriundos da dieta 225, 52-53, 53T, 415-416, 415B, 488-490
potencial mutagênico vs. carcinogênico 51F
procarcinógenos 50, 52, 53, 485, 486F
químicos 46-48, 47T, 56, 92, 484-485
hidrocarbonetos 48, 48F
incidência de câncer e 490
terminal 50, 485, 486F, 487
testes de laboratório para 54B, 455F, 455B
veja também Mutágeno(s); Mutagênese/mutagenicidade; *agentes específicos*
viral *veja* Vírus tumorais
- Carcinoma de células escamosas do reto 678
- Carcinoma de células escamosas vulvares 678
- Carcinoma de ducto *in situ* (DCIS) 389F, 530F
- Carcinoma endometrial
genes/proteínas do ciclo celular 297T
índice de massa corporal (BMI) e 10B
silenciamento do gene de reparo de pareamento
errôneo 503-504, 504F
- Carcinoma esofageal 31F, 645
veja também Esôfago de Barrett
- Carcinoma hepatocelular (HCC)
dimerização de Met e independência de ligante 137-138
encurtamento dos telômeros 394B
genes/proteínas do ciclo celular 297T
miofibroblastos 546F
mutações na *p53* 488
papel na inflamação 442-444, 443F, 455
sinalização por NF- κ B 447F
receptores de transplantes 678
vacinação e 726-727
vírus da hepatite B (HBV) 87, 115, 442-443, 443F, 678, 726-727
aflatoxina-B1 (AFBI) e 444B, 487, 488F
epidemiologia 444B
vírus da hepatite C (HCV) 87, 115, 443-444, 443F, 678
- Carcinoma invasivo de ducto na mama 39F, 529F, 616, 617F
- Carcinoma lobular de mama 529F, 616, 617F
- Carcinoma(s) 591, 592F
expansão de um adenoma 407, 407F
Formação a partir do epitélio 29, 30, 31F
invasivo 39, 39F
progressão multipassos 406F, 408
tipos 30, 30T
veja também tipos/localizações específicas
- Carcinomas benignos, definição 591
- Carcinomas corticais adrenais, mutação de *p53* na linhagem germinativa 333B
- Carcinomas de células basais (BCCs), via de sinalização Hedgehog 195F, 196, 779-780
- Carcinomas de células claras, doença de Von Hippel-Lindau 241
- Carcinomas de células de fuso 30B
- Carcinomas de células escamosas (SCCs) 30, 31F
células de músculo liso 530F
estroma tumoral 530F
mastócitos 530F
metástases 588
cérvis 592F
p53 e 318B
TGF- α e 30B
veja também tipos/localizações específicas
- Carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço (HNSCCs)
imunoevasão 694F
polimorfismo na *p53* e resposta à terapia 42F, 42B
suporte sanguíneo 557F
- Cariótipo 7
aneuplóide *veja* Aneuploidia
células de câncer 10-11, 12-13F, 12-13B, 397F, 510-511, 524-525
câncer colorretal 241
falha no ponto de verificação do ciclo celular 260F, 513
retinoblastoma 219, 219F
estado euplóide 11, 13F
humano normal 260F
malignidade hematopoiética 513B
mutantes de *BRCA2* 506, 507F, 508
veja também Cromossomo(s); Anormalidades cromossômicas
- Cariótipo especial (SKY) 12F, 397F
- Carne vermelha, carcinógenos 225, 53
- Cascata da MAP cinase 174-175, 175F
efeitos indiretos na *p53* 321
fosforilação por Erk 175-176, 175F
mitogênese em câncer de mama 199B
- Cascata de coagulação, embolização e metástase 28-29F, 28B
- “Cascata de invasão da metástase” 590, 591F, 593B, 652
- CASP8, hipometilação 229T
- Caspase 10 343
- Caspase 3 340, 341F, 342
- Caspase 6 342

- Caspase 9 340, 341F
 Caspase(s) executoras 341F, 342, 345F
 Caspase(s)
 “substratos de morte” 341F, 342
 ativação do receptor de morte 343, 344F
 cascata apoptótica 340-342, 341F, 345F
 executor 341F, 342, 345F
 expressão mediada por E2F 324, 342
 iniciador 342
 Caspase7 342
 “Catástrofe mitótica” 734, 734F
 Catástrofes genômicas 520
 Catenina(s)
 associação com E-caderina 603-604
 β -catenina *veja* β -catenina
 CCL22, recrutamento de células T regulatórias 704
 CD133, tumorigenicidade 418F
 CD28, melhora na apresentação de antígeno 715, 716-717F
 CDC2 (CDK1), ligação de ciclina A 263
 Cdc42 182, 205, 627, 627F, 628F, 629-630
 CDKs *veja* cinases dependentes de ciclina (CDKs)
 Cegueira para cores 10
 Celecoxib 449F, 578T
 Célula(s) de câncer
 alterações genômicas específicas 204
 anormalidades cromossômicas *veja* Anormalidades cromossômicas
 células-tronco *veja* Células-tronco tumorais
 controle do ponto de verificação e 45, 260-261
 veja também Ciclo celular; Relógio do ciclo celular
 efeitos do TGF- β 45, 288-289
 expressão da telomerase 376
 fenótipo dominante vs. recessivo 210-213, 212F, 252
 veja também Oncogene(s); Genes supressores de tumor (TSGs)
 formação *veja* Tumorigênese
 imortalidade 301-302
 veja também Imortalização
 independência estromal 25F, 255
 metastática *veja* Metástases
 metilação do DNA em 228, 229T, 230, 230F, 231F, 412
 mutações *veja* Mutação(s)
 natureza das 25-56
 produção de VEGF559
 superexpressão do receptor de EGF 708B
 tumorigenicidade de diferentes populações 417-418, 417F, 418F
 veja também alterações específicas
 Célula(s) T 32, 670F, 722
 auxiliares *veja* Células T auxiliares (células-T_H)
 câncer de pulmão de células não-pequenas (NS-CLC) 530F
 citotóxicas *veja* Linfócitos T citotóxicos (CTLs)
 estroma tumoral 530F
 regulatórias *veja* Células T regulatórias (T_{regs})
 Célula(s)-tronco
 bombas de drogas 471
 capacidade proliferativa 360, 418-419, 465
 como alvos mutagênicos 466-470, 518-519
 como tecido da “linhagem germinativa” 475
 comportamento autônomo da célula 261B
 criptas gastrintestinais 238, 238F, 240, 466, 467F
 defesas contra mutações 470-475
 apoptose induzida por irradiação 471
 bombas de drogas 471
 proteção física 464-466
 replicação da fita conservada (imortal) de DNA 471-475, 472-473F
 embrionárias 250B, 261B, 360
 hematopoiéticas, leucemia e 468
 malignas *veja* Células-tronco tumorais
 mamárias, efeitos na gravidez 20-21F, 20B
 organização tecidual 464
 pluripotentes 468
 progênie 419, 419F, 465, 465F, 468F
 dinâmica 466
 progenitoras comprometidas 469F, 470
 veja também Células amplificadoras (progenitoras) transitórias
 replicação
 divisão assimétrica 465F, 468F, 471
 divisão simétrica 468F, 474
 frequência 470
 tumores *veja* Células-tronco tumorais
 Células amplificadoras (progenitoras) transitórias 419, 419F, 419B, 468F
 aumento exponencial 465, 465F
 gastrintestinal 467F
 hematopoiéticas 469F
 risco de mutação 466, 518-519
 Células apresentadoras de antígeno (APCs) 659-661, 670F
 Células B 32, 670F, 722
 ativação, células T auxiliares (células-T_H) 661
 imortalizadas com EBV 1105
 Células CD4+ *veja* Células T auxiliares (Células-T_H)
 Células de músculo liso
 estroma tumoral 530, 530F
 microvasos 534-535F
 Células de Reed-Stenberg, linfoma de Hodgkin 529F
 Células de Schwann 35F, 234
 Células dendríticas (DCs) 659, 670F
 apoptose e TGF- β 698
 apresentação de antígeno 659-660, 660F
 Ativação por GM-CSF 714
 linfonodos 662F
 terapia por imunostimulação 714-715
 Células do plasma 32, 661, 670F
 Células endoteliais
 angiogênese 532, 556-563, 559F
 apresentação do receptor Fas 571, 573F
 associadas a tumor, terapias antiangiogênicas 575
 ductos linfáticos 532
 estroma tumoral 530, 582
 fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) 532
 fator de crescimento epidermal que liga heparina 532
 interações heterolíticas, tumorigênese 584F
 ligação ao fator de crescimento de fibroblasto básico (bFGF) 559
 linfoangiogênese 560B
 microvasos 534-535F
 precursores *veja* Células precursoras endoteliais (EPCs)
 vasos sanguíneos 532
 Células epiteliais
 no estroma tumoral, liberação de PDGF 532
 proliferação, fatores de crescimento de fibroblastos (FGFs) 537
 reciclagem 466
 tipos 29-30
 vulnerabilidade a dano 465-466
 Células excretoras de muco 30, 31F, 466
 Células fagocíticas, produtos oxidativos 482B
 Células germinativas, expressão da telomerase 376
 Células haplóides 9
 Células HeLa 360, 515F
 Células hematopoiéticas 32
 células-tronco 468, 469F
 diferenciação 469F
 bloqueada 468, 470B
 Células híbridas
 aparência das células 211F
 divisão celular e 212
 genética do xeroderma pigmentoso 499-500
 heterocáion 210
 híbridos humano-galinha 212
 identificação de genes supressores de tumor 210-213
 metodologia 210-212, 211F
 natureza recessiva das células cancerosas vs. natureza dominante 212, 212F
 ploidia 211, 212
 poli-cáion 210, 211F
 Células linfóides, fator de transcrição E2F e desenvolvimento 6B
 Células matadoras ativadas por linfocina (LAK), ativação por interleucina-2 718
 Células mesenquimais 31, 404
 Células musculares *veja* Miócito(s)
 Células precursoras endoteliais (EPCs)
 angiogênese *veja* Angiogênese
 CXCL12 e 570
 miofibroblastos e 551, 552F, 558
 VEGF e 570-571
 Células progenitoras (amplificadoras transitórias) *veja* Células (progenitoras) amplificadoras transitórias
 Células T auxiliares (células T_H) 670F, 722
 apresentação de antígeno 660-661, 661, 662F
 ativação de células B 661
 ativação de células T citotóxicas 664-665, 665F
 ligação a TATA 690
 produção de interferon- γ 665
 produção de interleucina-4 665
 Células T matadoras naturais, RAG-1/RAG-2 674
 Células T regulatórias (T_{regs}) 669, 670F, 704, 722
 imunoevasão *veja* Imunoevasão
 Células vermelhas do sangue *veja* Eritrócitos
 Células(s)
 adesão *veja* Biologia da adesão celular 1-24
 células de câncer *veja* Clones de células cancerosas 14, 14F
 citoesqueleto *veja* Citoesqueleto
 diagrama completo de conexões 203
 diferenciação *veja* Diferenciação celular
 divisão *veja* Divisão celular
 especialização 28-32
 humanas, resistência à transformação 431-434
 imortalização *veja* Imortalização
 membrana *veja* Membrana Plasmática
 motilidade *veja* Motilidade/movimento celular
 números de (tempo de vida) 43
 potencial replicativo *veja* Capacidade replicativa
 transformação viral de *veja* Transformação viral
 veja também Tecido(s); tipos específicos
 Células-tronco embrionárias
 comportamento autônomo da célula 261B
 mutação dominante-negativa no gene *p53* mutações 315B
 potencial replicativo 360
 Células-tronco tumorais 335, 461, 518
 citometria de fluxo 416-418, 416F, 417F, 418F
 como “linhagem germinativa” 419
 efeitos no tratamento do câncer 765, 765F, 765B, 792
 expansão clonal e 416-420, 420F
 metástase e 33B
 organização 419
 progênie 419, 419F
 Centrômeros 369
 Centrosomos 258F, 514F
 ciclos de quebra-fusão-ponte 371F
 duplicação 514-515
 fosforilação durante o ciclo celular 263
 segregação cromossômica e 513, 514, 514F
 Cepas de camundongo imunocomprometidos 35B
 Cepas intercruzadas de camundongos 35B, 70-71, 70B, 71F
 Cerebelo, pós-mitótico 273F
 Cetuximab *veja* Erbitux (cetuximab)
 CHOP, linfoma grande difuso de células B (DLBCL) 711
 Ciclina A
 duplicação dos centrosomos e 514-515
 efeitos no fator de transcrição E2F 281-282
 flutuações no ciclo celular 265, 265F
 ligação a CDK2 263
 Ciclina B
 flutuações no ciclo celular 265, 265F
 ligação a CDC2 (CDK1) 271
 Ciclina D 304
 controle transcricional 267
 flutuações no ciclo celular em nível 265-267, 265F
 fosforilação da proteína RB 277, 283, 297-298, 305
 knock-outs 303B
 ligação ao receptor de estrogênio 267B
 ligação de CDK4/6 263, 267
 bloqueio pela p15^{ink4B} 268
 estimulação por p21^{Cip1}/p27^{Kip1} 271-272

- outras funções além do controle do ciclo celular 267B
 redundância 267
 sinalização extracelular e 265-266, 266F, 267T, 283, 283F
veja também tipos específicos
- Ciclina D1
 alterações no câncer 297-298, 297T
 amplificação gênica 298, 298F
 controle do promotor 266F, 267, 283
 controle dos níveis 266, 266F, 283, 283F, 284
 mitógenos 277, 283, 283F
 diferenciação celular e 292
 fosforilação de GSK-3 β 190, 206, 284
 ligação a CDK4/CDK6 263
 vias de sinalização 267, 283, 283F
- Ciclina D2
 ativação de Jak-STAT 185-186
 ativação Myc de 267, 286-287, 286F
 controle do promotor 267, 284
 ligação a CDK4/CDK6 263
- Ciclina D3
 ativação de Jak-STAT 185-186, 267
 controle do promotor 267, 284
 ligação a CDK4/CDK6 263
- Ciclina E
 alterações no câncer 297T
 ciclina E1 263, 297T
 ciclina E2 263
 ciclo de retroalimentação positiva 281, 282F
 duplicação dos centrôsomos e 514-515
 flutuações 265, 265F
 fosforilação da proteína Rb 277, 281, 299, 30B
knock-outs 303B
 prognóstico e 303-304, 303F
 transcrição ativada de E2F 281
 transição do ponto R e 277
- Ciclina(s) 262-268, 304
 alterações no câncer 296T, 297-298, 297T
 animais *knock-out* 303B
 associação com a CDK *veja* Complexos ciclina-CDK
 como alvo terapêutico 739
 degradação 265
 estrutura 264F
 flutuações no ciclo celular 265-266, 265F
 regulação 264-268, 268F
veja também ciclinas individuais
- Ciclo celular 256-261, 258F, 304
 células-tronco embrionárias 261B
 citocinese 256, 258, 258F
 controle/regulação *veja* Relógio do ciclo celular
 fase G₁ 257, 302
 crescimento vs. quiescência 256, 261-262
 genes tardios 281
 ponto R (restrição) 262, 262F, 267, 272F, 273, 277-278, 297F, 301, 304, 515
 fase G₂, 258, 258F
 fase M 256, 258-259, 258F
 mudanças nos níveis de ciclinas 265, 265F
 pontos de verificação 260
veja também Mitose
 fase S 258, 258F, 259, 281
 G₀ (fase de descanso) 256, 257, 258F, 281
 interfase 258F, 513-514
 números em camundongos vs. humanos 433
 replicação de DNA 257
 retirada do 257
 p53 e 316, 327-329
 proteína Id1 295
veja também Diferenciação celular
- Ciclo menstrual, promoção de tumor e 20-21F, 20B, 440-441, 441F
- Ciclo reprodutivo, promoção de tumor 440-441, 441F
- Cicloeximida 161
- Ciclofosfamida, leucemia mielógena aguda e 728
- Ciclopamina 776-782
 como teratogêno 777, 777F
 estrutura 777F
- mecanismo de ação 777, 778-779F
 inibição Smoothened 778-779F, 780, 781F
 via Hedgehog 780, 782F
 síntese, dificuldade 781
 toxicidade 781
- Ciclopia 777
- Ciclos de quebra-fusão-ponte (BFB) 371F, 372, 375, 392, 397, 453
 alterações cromossômicas devido a 372, 372F, 391, 397F, 511
 cronometragem 375B
 doença inflamatória e câncer 393, 394F, 394B
 instabilidade cromossômica e 391, 393, 397F
 mecanismo ALT e 391
 pressão seletiva de 391
 tumorigênese e 390-391, 392, 392F, 393, 396
- Ciclos de retroalimentação negativa 198, 198F, 202
 regulação da p53 326
 sinalização pela Ras 152-153, 198
- Ciclooxigenase-2 (COX-2)
 alterações em tecidos histologicamente normais 175
 como mediador inflamatório 448-451, 450F, 451F
 estrutura 448F
 indução por NF- κ B 448
 inibidor 448, 448F, 449F, 451F, 456-457
veja também Drogas antiinflamatórias não-esteroidais (NSAIDs)
 padrões de expressão 449-450, 450F
 prevenção do câncer e 449F, 456-457
 promoção de tumor e 448-451, 451F, 456-457
 síntese de prostaglandinas 448F, 450, 450F, 457
- Ciliato, telomerase 141j 145, 378, 378F
- Cinase associada à ciclina G (GAK), superexpressão de receptor de crescimento e 132B
- Cinase ativadora da cinase dependente de ciclina (CAK) 274B
- Cinase ATM
 fosforilação de Mdm2 320
 indução da p53 317-318, 320-321 F, 352
 tipos de mutação 313F
- Cinase ATR (relacionada a ATM)
 indução de p53 e 317, 320-321F
 perda 260F
- Cinase Chk2 245, 320-321F, 333, 351
- Cinase Chkl, fosforilação de p53 320
- Cinase de adesão focal (FAK) 148, 187F, 206
 fosforilação pela Src da 186-187
- Cinase dependente de ciclina 1 (CDK1 /CDC2), ligação da ciclina A 263
- Cinase dependente de ciclina 2 (CDK2)
 estrutura 743F
 ligação da ciclina 263, 268
- Cinase dependente de ciclina 4 (CDK4)
 alterações no câncer 297T, 298
 ativação Myc de 286F
 ligação à D ciclina 263
 ligação de MyoD 295
- Cinase dependente de ciclina 6 (CDK6)
 alterações no câncer 297T
 ligação à D ciclina 263
- Cinase(s) dependente(s) de ciclina (CDKs) 262-268, 304
 alterações no câncer 296T
 associação com ciclina *veja* Complexos ciclina-CDK
 cinase ativadora de CDK (CAK) 274B
 como alvo terapêutico 739
 estrutura 264F
 identidade de sequência 263
 inibidores *veja* Inibidores da cinase dependente de ciclina (CDKIs)
 modificação covalente 273, 274B
veja também CDKs individuais
- Cinases reguladas por sinais extracelulares *veja* Erks (Cinases reguladas por sinais extracelulares)
- Cinases *veja* Proteínas cinase(s)
- Cinetocóro 513
- Circuitos de retroalimentação positiva 202, 281, 282F
- Citocina(s)
 genes de início imediato 162
 imunologia tumoral 721
- receptores, sinalização Jak-STAT 185-186, 185F, 206
veja também tipos específicos
- Citocinese 256, 258, 258F
 mutantes BRCA2 506, 507F
veja também Mitose
- Citocromo c, papel na apoptose 336-337, 337F, 340-341, 341F
- Citoesqueleto 15, 16F
 actina *veja* Actina
 alterações induzidas por fator de crescimento 163, 163F
 clivagem pela caspase 342
 integrinas e 148, 149F
 motilidade celular e 16F
 Rho GTPases 182
- Citologia, displasia 37
- Citomegalovírus (CMV), imunoevasão 345
- Citometria de fluxo 416-418, 416F, 417F, 418F
- Citoqueratina, transição epitelial-mesenquimal 608F, 609
- Citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC) 722
 células matadoras naturais (NKs) 657, 657F
 Herceptina 706-707
- Citotoxicidade dependente do complemento 701
- Clonagem reprodutiva 14F
- Clones/clonagem 14, 14F
 antígenos de melanoma 39F, 39B
 na genética do câncer 23-24
 oncogenes transfectados 104F, 1045
 papéis de mutágenos/carcinógenos 54
 princípios gerais 24, 24F
 TSTAs quimicamente induzidas 687
- c-myc *veja* gene(s) c-myc
- Coágulos sanguíneos /coagulação 122
- atalhos peritoneoventrosos e 325
 cura de ferimentos 538, 540F
 embolização e metástase 28-291 285
- Co-dominância 4
- Colagenase-1 (metaloproteinase-1 de membrana; MMP-1) 564T
- Colágeno(s) 28F
 estroma desmoplástico 546
 matriz extracelular 147
 substrato da metaloproteinase da matriz 622
- Colite ulcerativa
 encurtamento de telômeros 394F, 394B
 formação de aduto de DNA 496
 inflamação e carcinogênese 442F, 442B
- Cólon
 câncer *veja* Câncer colorretal
 inflamação 442F, 442B
 microanatomia 404F
 organização do epitélio 236, 238F, 403-404
- Colonização *veja* Metástase
- Coloração com anexina V, detecção de apoptose 7F, 7B
- Coloração cromossômica 12F, 397F
- Compartimento de células-tronco 464
- Complementação genética, xeroderma pigmentoso (XP) 500, 500F
- Complemento 663, 663F, 670F, 722
 imunoevasão e 701, 702F, 703
- Complexo de histocompatibilidade maior (MHC) 722
 apresentação de antígeno 659-660, 660F, 661F
 classe *veja* Complexo de histocompatibilidade maior de classe I (MHC I)
 de classe II 659-660, 660F
 apresentação de antígeno 660-661, 661F
- Complexo de histocompatibilidade maior (MHC), rejeição de classe do enxerto 671, 671F
 apresentação de antígeno 661F
 antígenos intercelulares 663-664, 664F
 linfócitos T citotóxicos (CTLs) 664-665
 células matadoras naturais e 694, 695, 695F, 696
 interferon- γ e 673
 supressão
 cânceres de pulmão de células não-pequenas (SCLCs) 693, 693B
 imunoevasão 691, 693F, 693B, 695
 melanomas 693, 693B

- neuroblastomas na infância 693, 693B
testes, expressão em 689
Complexo de sinalização indutor de morte (DISC) 343, 344F
Complexos ciclina-CDK 263
Ciclinas-A CDC2 (CDK1) 263, 271, 295
Ciclinas-A CDK2 263, 268, 281-282
Ciclinas-B CDC2 (COK1) 271
Ciclinas-D CDK4/CDK6 263, 267, 271-272, 277
Ciclinas-E CDK2 263, 268, 271, 277, 281, 295, 299
como alvos terapêuticos 739
duplicação dos centrôssomos e 514-515
estrutura 264F
pareamento destes durante o ciclo celular 264F
regulação
 auto-regulação 268
 inibidores de CDK (CDKIs) 268-273, 272F
 modificação de COK 273, 274B
 níveis de ciclina 264-268, 268F
Comportamento reprodutivo, incidência de câncer e 45, 46
Compostos líder 44B
Comunicação célula-célula *veja* Comunicação intercelular
Comunicação intercelular 15-16, 120, 121-123
 arquitetura tecidual e 121, 121F
 da superfície celular para o núcleo 161-164
 evolução 130B, 156
 fatores de crescimento *veja* Fatores de crescimento integrinas *veja* Integrina(s)
 papel no câncer 119-158, 197-198
 veja também Receptores de superfície celular; *moléculas/vias específicas*
Comunicação intracelular 156, 159-208
 “proteínas de endereço duplo” 193-197, 194F, 195F, 201
 analogia circuito/placa 159-160, 160F
 como equilíbrio dinâmico 203
 complexidade 201-204
 conectividade cruzada 202, 202F
 em células de câncer 197-199
 genes de início tardio 164B
 IEGs 164B
 mutações colaborativas 428-429, 460F
 “proteínas de endereço duplo” 195F
 Sinalização pela proteína G 191-193
 vias envolvidas 432-433, 432F
 evolução 199, 200
 fatores controladores 200-201
 genes de início imediato 161, 161F, 162, 162T, 164B
 genes de início tardio 162, 163F, 164B
 mecanismos de retroalimentação 198, 198F
 mecanismos de retroalimentação negativa 202
 natureza combinatorial 200
 organização da via 199-204
 papel da fosforilação da tirosina 151, 166-171
 veja também Homologia de domínios Src (SH)
 Ras e *veja* Sinalização pela Ras
 segundos-mensageiros 177
 sinais aferentes 200
 sinais eferentes 200
 veja também *efetores/vias específicas*
Condensados do alcatrão de hulha, como carcinógenos 46, 47F
Conservação evolutiva
 genes/proteínas 8B, 22, 23B
 processos de desenvolvimento 8B, 30
 proteínas de bolso 276F
Controle transcricional
 expressão de ciclina D 267
 fatores de transcrição *veja* Fatores de transcrição
 histona desacetilase (HOAC), proteínas RB/bolso e 280, 280F
 indutores 144F
 metilação do DNA e 227, 232
 promotores *veja* Elementos promotores
 proteínas RB e de bolso 278-282, 280F
 proto-oncogene(s) 103
 repressores 144F, 279F, 280-281, 280F, 287
 transdução de sinal 201
 viral 82-83, 83F
Conversão gênica 217, 218F
Corpos apoptóticos 329, 330F
Corpúsculo de Barr 11B, 40
Correlações genotípicas-fenotípicas 15-19
 câncer progressão 459, 459F
 progressão de câncer colorretal 408
Cosimento, formação de mutágenos 52, 488-490
COX-2 *veja* Cicloxigenase-2 (COX-2)
CP547, terapia antiangiogênese 578T
Crescimento celular 256
 controle 119-120, 120F
 Akt/PKB e 181, 181T, 182F
 veja também Fatores de crescimento
 efeitos mutagênicos 93
 genes controle *veja* Genes controladores do crescimento
 proliferação (divisão) vs. 257, 257F
 proteína Myc e 288
 resistência a sinais inibitórios 458
 veja também Ciclo celular; Divisão celular; Proliferação celular
Crescimentos adenomatosos 37, 38F, 39
 veja também Adenomas; Papiloma(s)
Criação de fibras de estresse, metástase 625F, 628F, 629
Crick, Francis H. C. 1
Criptas gastrintestinais 405F
 células-tronco 466, 467F, 470
 histopatologia da progressão tumoral 405F
 migração de enterócitos 238-239, 238F, 466, 467F
 apoptose e 238F, 239, 329
 mutação em Apc e 239-241, 412B
Criptas intestinais *veja* Criptas gastrintestinais
Crise celular 364, 368F, 397
 comprimento dos telômeros e iniciação 368, 369, 370, 372, 375B, 395
 prevenção pela expressão de telomerase 376-380, 379F
 veja também Apoptose; Senescência celular; Telomerase; Telômero(s)
Crista neural 34
Crocilolite, mesotelioma 675
Cromatina
 apoptose e 329, 330F
 controle transcricional e 227, 280, 280F
 senescência e 12-13F, 125
Cromossômicos politênicos 9F
Cromossomo 1, conteúdo gênico 7-8
Cromossomo 11, análise do número de cópias 421, 422F
Cromossomo 13, gene *Rb* 219, 219F
Cromossomo 14, translocação recíproca no linfoma de Burkitt 109F
Cromossomo 17
 análise do número de cópias 421, 422F
 perda de heterozigiosidade, câncer colorretal 223F, 409, 409F
Cromossomo 18, perda de heterozigiosidade 223F, 409, 409F
 veja também gene *p53*
Cromossomo 5
 coloração 12F
 perda de heterozigiosidade 409, 409F, 410 *veja também* gene/proteína *Apc*
Cromossomo 8
 instabilidade cromossômica (CIN) 51 2F
 translocação recíproca no linfoma de Burkitt 109F
Cromossomo Filadélfia 49, 112, 113F, 116, 511, 757-758, 758F
 estrutura 49F
 mutação em células-tronco 468
 proteína de fusão *veja* Proteína de fusão Bcr-Abl
Cromossomo X 9, 10F
 desordens/traços ligados ao X 10
 silenciamento *veja* inativação X
Cromossomo Y 9, 10F
Cromossomo(s)
 alterações em *veja* Anormalidades cromossômicas
 análise do número de cópias
 FISH 421, 422F
 hibridização genômica comparativa 422-423, 422F, 423F
 apoptose e 329, 330F
 autossomos 9
 cariótipo *veja* Cariótipo
 centrômeros 369
 ciclos de quebra-fusão-ponte *veja* Ciclos de quebra-fusão-ponte (BFB)
 conteúdo gênico 7-8, 10F
 cromossomos sexuais 9, 10F
 estrutura 12-13F
 fusões extremidade-extremidade 369, 369F, 370
 genética mendeliana 7-10
 localização gênica (loco genético) 8, 9F
 metáfase 9F
 padrões de bandas 12F
 segregação 512-514, 514F
 veja também Citocinese; Mitose
 telômeros *veja* Telômero(s)
 veja também DNA; Gene(s); *cromossomos individuais*
Cromossomos da glândula salivar 9F
Cromossomos de minuto duplo 13F, 135, 107B, 108, 116, 318
Cromossomos dicêntricos 372, 372F
Cromossomos metafásicos 9F, 258, 258F, 369F
Cromossomos sexuais 9, 10F
Cromossomos tetrarradiais 508, 510
Cromossomos trirradiais 508, 510
CRSP3, gene supressor de metástase 643T
Csk, estrutura 743F
c-src *veja* gene(s) src
Cspase 8 343, 349
CTLA-4, melhora na apresentação de antígenos 715-717, 716-717F
Cul1 proteína 287, 299, 299F
Cultura de células
 capacidade replicativa 355F, 359-360
 estresse fisiológico e 365, 365F
 células de camundongo vs. humanas 386
 células primárias 425
 comportamento de células transformadas vs. células normais 62-63, 122, 131, 147
 culturas confluentes 62
 ensaios, Gleevec 747, 748F
 falhas das células cancerosas de se adaptarem à 362B
 imortalização mediada por RSV40 675
 inibição por contato 63
 jejum de soro 161
 transformação mediada por RSV 61-63, 63F, 64F
 manutenção de 63-65
 veja também Linhagens celulares
cura de ferimentos 537-578, 540F, 544F
agregação de plaqueta 537
angiogênese 539
células epiteliais
 junções aderentes 541, 542F
 ligações 541F
 mobilidade 539, 541
 proliferação 537
coágulo sanguíneo 538, 540F
contração 545
E-caderinas, substituição 541
fator de crescimento de fibroblastos 544F
fator de crescimento endotelial vascular 544F
fator de transcrição Slug 616, 618F
fatores vasoativos 537-538
fibroblastos 537, 540F
liberação de interferon- γ 539
liberação de PDGF 537, 539, 544F
liberação de TGF- β 537, 539, 544F
metaloproteínas de matriz 538-539, 541T
migração de eosinófilos 539
migração de linfócito 539
migração de monócitos 539, 544F
migração macrófago 539
migração mastócito 539

- migração neutrófilos 539, 544F
miofibroblastos 545, 546F
transformação e 430B
transição epitelial-mesenquimal 541-542, 543F, 544F, 600, 601
transição mesenquimal-epitelial 542, 543F, 544F
cura de ferimentos *veja* Cura de ferimentos; Transição epitelial-mesenquimal (EMT) 34, 584-585, 597-624, 652
alterações bioquímicas 603F
alterações no fenótipo celular 601
citoesqueleto 615
cura de ferimentos 541-542, 543F, 544F, 600, 601
efeitos do microambiente 605, 606F
embriogênese vs. 600, 600T, 601 F, 620F
expressão de E-caderina 31B, 543F, 597, 602F, 603-604
afinidade com fibroblastos 604, 605F
Indução pelo fator de crescimento transformante β 609
N-caderina vs. 543F, 604-605
fatores de transcrição 615-620, 615F, 616T, 619F, 620F
E47/E2A 616T
fator de transcrição Goosecoid 616, 616T
fator de transcrição SIP1 616T, 619F
fator de transcrição Slug 615-616, 616T, 619F
fator de transcrição Snail 615-616, 616F, 616T, 619F
fator de transcrição Twist 603F, 615-616, 616T, 619F, 620F
FOXC2 616T
fronteiras com o carcinoma 601, 602F, 650
gastrulação 600-601
histopatologia 605-608, 606F, 607F, 608F, 609
macrófago associado a tumor (TAMs) 612-613, 612F
NF- κ B 611, 611F
perfis de expressão gênica 601-602, 603T, 615F
actina 603F
citoqueratina 608F, 609
E-caderina *veja*
expressão de *COH1* 604
fibronectina 543F, 603F
N-caderina 602, 603F, 604
vimentina 543F, 602, 603F, 608F, 609
 β -catenina 602F
proteases extracelulares 621-624
ativador de plasminogênio tipo urocinase (uPA) 623-624, 624F
metaloproteínas da matriz 606F, 621-623, 621F, 650
remodelação da matriz extracelular 622
veja também proteases específicas
proteína Met 583
reversibilidade 605, 606F, 607B
sinais do estroma 605-614, 615F, 619
fator 1 de crescimento semelhante à insulina 609
fator de crescimento de hepatócito 31B, 609, 614, 614F
fator de crescimento epidermal 315, 609, 612-614
fator de crescimento transformante β 305, 315, 609-611, 610F, 614
fator de necrose tumoral α 31B, 609, 611, 614
fator estimulador de colônia 611-612, 612-614, 612F, 613F
produção celular autônoma 31B
veja também Transição mesenquimal-epitelial (MET),
Curvas de dose-resposta 745, 745F
CXCL12 532, 551, 570
Cyts *veja* Enzimas do Citocromo p450 (Cyts)
- D**
- Dano ao DNA 517
acumulação relacionada à idade 361B
compostos exógenos 483-490
veja também Carcinógenos; Mutágeno(s)
depirimidinização 480
depurinação 480, 481F
desaminação 480, 481F
em nível cromossomal *veja* Anormalidades cromossômicas
formação de adutos 485, 486F
formação de dímeros 484, 485F
indução de p53 e 316, 317-318, 317F, 3185, 325-329, 351
induzida por radiação 318B, 471, 484, 485F
veja também Irradiação ultravioleta B (UVB); irradiação X
ocorrência diária 454
oxidativo 481-482, 483F, 524
estimativa do 483B
taxa metabólica e 482, 484F
prevenção/reparo 490-493, 517, 524-525
glutathione-S-transferases 491-492
organização/estrutura tecidual 464-466, 465F, 490-491
ponto de verificação do ciclo celular e 259, 259F, 270, 513
reparo de DNA *veja* Reparo de DNA
scavengers de radicais livres 491
taxa de falha 492
variações individuais 493B
processos endógenos 479-482
quebras dupla-fita de DNA *veja* Quebras dupla-fita (D5Bs)
replicação de DNA e 328, 475-479, 524
senescência celular e 367
veja também Replicação do DNA; Mutação(s); mecanismos específicos
Dano oxidativo (DNA) 481-482, 483F, 524
estimativa do 483B
taxa metabólica e 482, 484F
Darwin, Charles 2F
influência na biologia 2
na *origem das espécies* 2F
veja também Evolução darwiniana
genética mendeliana e teoria da evolução 4-7
De-diferenciação 34
Defeitos de abscisão, mutantes para *BRCA2* 506, 507F
Degeneração neurológica paraneoplásica (PND) 37F, 37B
Degradação/reciclagem proteica 242-243B
ciclina(s) 265
como mecanismo regulatório 315
gene/proteína p53 314-315, 318, 354
Mdm2 e 318-319, 319F
números de genes 31B
veja também Protease(s); Proteossoma(s); Ubiquitilação (ubiquitinação)
Deleções cromossômicas 13B
gene/proteína *Rb* (retinoblastoma) 219
intersticiais 13B
veja também Perda de heterozigiosidade (LOH)
Deleções intersticiais, gene/proteína *Rb* (retinoblastoma) 219
Demografia 787, 788F
Dentes, metástases em locais de extração 33B
Depirimidinização 480, 482
Depurinação 480, 481F, 482
Derivatização, desenvolvimento de drogas 745
Desacetilase de histona (HOAC), controle transcripcional e 227, 232, 280, 280F
Desaminação 480, 481F
Desenho de drogas auxiliado pelo computador 790, 791F
“Desenho racional de drogas” desenvolvimento de drogas 744
Desenvolvimento de drogas 744-755
“desenho racional de drogas” 744
afinidade de ligação 745
alvos futuros 793, 794F
aplicações clínicas 745
compostos líderes 445
curvas de resposta a drogas 745, 745F
derivatização 745
descarte do 754
desenho auxiliado por computadores 790, 791F
efeitos colaterais 745
efeitos em múltiplos alvos 764-765, 792-793
efeitos fora do alvo 745
estrutura do alvo 744, 744F
eventos pós-traducionais como alvos 43F, 43B
índice terapêutico 747-748, 751
predição de resposta clínica 744
produtos naturais 776-782
reducionista vs. “biologia de sistemas” 793-794
taxa de sucesso 754-755
teste do modelo celular 746-747, 748F
testes clínicos *veja* Testes clínicos
testes pré-clínicos (estudos em animais) 747-751
farmacocinética 750, 750F
farmacodinâmica 750-751, 750F
índice terapêutico 751
Iressa 768
modelos humanos de tumor transplantado 749-750, 749F, 792
toxicidade 751
triagem em larga escala (HTS) 44F, 445
veja também drogas específicas
vias de sinalização 791
Desenvolvimento do olho 8B, 165, 165F, 257F
Desenvolvimento/embriogênese
angiogênese 556-557
C. elegans 358F
conservação evolutiva 8B, 30
expressão da telomerase durante 376
expressão gênica e 19-21
linhagens celulares 358-359, 358F
mutações na linhagem germinativa 142B, 2265
origens epiteliais 29-30, 30F
papel na apoptose 329, 331F, 335, 358F
transição epitelial-mesenquimal 600, 600T, 601F, 620F
Desordens/traços ligados ao sexo 10
Desordens/traços ligados ao X 10
Desoxitimidina glicol 482, 483F
Diabete, destruição auto-imune das células β 668F
Diacilglicerol (DAG) 177, 191, 191F, 438
Diagnóstico de câncer 727-732
arranjos de expressão gênica 728-729, 731
bioinformática, estratificação do câncer 729
embasamento da natureza da doença 727
falácias sobre a progressão de crescimentos benignos 788, 789B, 790
importância para a terapia 727-728, 728, 729-730, 732, 787-788
marcadores moleculares 727
problemas resolvidos de técnicas 788, 789F
proteossômica 731-732
Diapedese 595B
Dieta, mutágenos/carcinógenos na 22B, 52-53, 53F, 415-416, 4155, 488-490
Diferenciação celular 20-21
células hematopoieticas 469F
células musculares 292-293, 294F, 295F
desdiferenciação 34
estado pós-mitótico 255, 257, 292
papel de CDKI 273, 273F, 293
expressão da telomerase 376
fatores de transcrição bHLH 285, 294, 295F
papel do fator de crescimento transformante β 288
patogênese do câncer e 292
progressão tumoral e 293F, 293B
proliferação vs. 292
proteína Myc e 285, 294-295
proteína RB e 292-296, 305
sinalização por ErbB 120F
sinalização Wnt e 189
transdiferenciação 34
vulnerabilidade a dano 465-466
7,1 2-dimetilbenz[a]antraceno *veja* DMBA (7,12-dimetilbenz[a]antraceno)
Disfunção neurológica
síndromes paraneoplásicas 37F, 37B
veja também Tumores no cérebro

- xeroderma pigmentoso 500
 Displasia 9F, 37, 38F, 55, 406
 tecido normal vs. 26F
 Disqueratose congênita 388F, 388B, 391
 Disquerina 388B
 Divisão celular 256
 células-tronco
 assimétricas 465F, 468F, 471
 frequência 470
 simétricas 468F, 474
 controle 119-120, 120F
 crescimento celular vs. 257, 257F
 mecanismo *veja* Mitose
 número de (humana vs. de camundongo) 386
 números em camundongo vs. humanos 433
 risco de câncer e 43, 386
veja também Ciclo celular; Crescimento celular;
 Proliferação celular; replicação do DNA
 DMBA (7,1 2-Dimetilbenz[a]antraceno) 435
 como carcinógeno mamário 205
 como iniciador de tumor 436, 4395
 mutagenicidade 437
 promotor de tumor TPA e 435-436, 436F
 DNA complementar (cDNA) 24
 gene Rb 221F
 gene *src* 75, 76F, 765
hTERT e imortalização 378, 380F
 técnicas de hibridização 99F
 “DNA faz RNA que faz proteína” 16
 DNA intergênico (“lixo”) 6
 DNA codificante vs. 6, 6F, 7
 polimorfismo 2B
 DNA metiltransferases 494-495
veja também enzimas específicas
 DNA microssatélite 477
 DNA polimerase α 475
 DNA polimerase β 328, 496, 498
 DNA polimerase δ 475
 DNA polimerase ϵ 47B
 DNA polimerase ν , reparo predisposto a erro 500
 DNA polimerase(s) 475-476
 escolha de cópia 384, 385F
 holoenzima telomerase 377
 reparo por excisão de bases 496
 reparo por excisão de nucleotídeos 497
 reparo predisposto a erro 498-499, 500
 replicação de extremidade 374-375
 taxa de erro 475, 478, 524
 uso viral de 605
veja também polimerases individuais
 verificação 476-477, 476F, 479
 câncer incidência e 477, 477F
 DNA polimerases *bypass* (propensas a erro) 498-499, 500
 DNA repetitivo
 clonagem de oncogenes transfectados 104F, 1045
 instabilidade de microssatélites *veja* Instabilidade
 de microssatélites (MIN)
 reparo de pareamento errôneo e 477-478, 478F
 telômero(s) 370, 373
 DNA
 análise por *Southern blot* 99F
 bases *veja* Base(s) do DNA
 características apoptóticas 329, 330F
 codificação de informação *veja* Gene(s)
 descoberta 1, 15
 efeitos do bissulfito de sódio 3F, 3B
 estabilidade 463-464, 479-480, 517, 524
 DNA linear 368
 intergênico (“lixo”) 25, 6
 DNA codificante vs. 6, 6F, 7
 manutenção 226, 463-526
 veja também Genes *caretaker*; Dano ao DNA;
 Reparo de DNA
 modificação diária do 454
 repetitivo *veja* Replicação repetitiva do DNA *veja*
 Replicação do DNA a partir do RNA (trans-
 crição reversa) 74, 74F
 sequência
 análise 423, 458
 motivos de ligação de fator de transcrição 21
 mutação *veja* Mutações(s)
 oncogene H-ras vs. proto-oncogene 105
 regiões codificantes *veja* Gene(s)
 variação natural *veja* Polimorfismo
 síntese *veja* Síntese de DNA
 transcrição *veja* Transcrição
 veja também Cromossomo(s); Genoma(s)
 DNA-lixo *veja* DNA intergênico (“lixo”)
 Doença de Hodgkin
 células Reed-Steinberg 529F
 receptores de transplante 678
 tipos celulares 528, 529F
 vírus Epstein-Barr (EBV) 678
 Doença de von Recklinghausen *veja* Neurofibroma-
 tose, tipo 1
 Doença mieloproliferativa, terapia 762
 Doenças auto-imunes 668, 668F
 exacerbação, anticorpos anti-CTLA4 717
 síndromes paraneoplásicas 371j 375
 Doenças infecciosas
 câncer como 35B, 58, 87
 etiologia do câncer 87, 114-115, 482B
 câncer cervical 73
 câncer gástrico 60-61, 115
 linfoma de Burkitt e 68, 109, 110B
 potencial para redução 455-456
 sarcoma de Kaposi e 88B
 inflamação devido a *veja* Inflamação
 veja também Vírus de tumor; Infecções/organismos
 específicos
 Dominância incompleta 4, 5F
 Domínio de morte associado à Fas (proteína) (FADO)
 343, 344F
 Domínios de homologia Src (SH) 166-171, 204
 como unidades modulares da estrutura de proteí-
 nas 170F
 domínios SH1 166F, 167, 204
 domínios SH2 166F, 167-170, 167F, 171T, 204
 ativação da Ras 171-173
 especificidade de sequência 167
 funções alternativas 172F, 172B
 ligantes 167
 sinalização *downstream* 169-170
 STATs 186
 transdução de sinal por RTK e 168, 165F
 domínios SH3 166F, 170-171, 204
 ligantes 170
 proteínas contendo 171T
 Domínios de Pleckstrina (PH) homologia 170F, 171T,
 205
 Akt/PKB 179
 ligação a PIP₃ 179, 179F, 180F, 181-182
 Rho 181
 Domínios PH *veja* Domínios de homologia Plecks-
 trina (PH)
 Domínios PTB 171, 171T
 Domínios SH *veja* Domínios de homologia Src (SH)
 Domínios transmembrana, EGF-R 127, 128F
 Dose máxima tolerada (MTD) 455F, 455B, 751
 Dosimetria 747, 751
DPC4/MAOH4 veja Gene/proteína
 “Drenagem” de linfonodos, metástase 632, 633F
 Drogas antiinflamatórias não-esteroidais (NSAIDs)
 efeitos colaterais/complicações 445, 457
 mecanismo de ação 448, 448F, 451F
 veja também Ciclooxigenase-2 (COX-2)
 proteção/prevenção do câncer 445, 448, 449F,
 451F, 454, 456-457
 Drogas antiinflamatórias, proteção/prevenção ao cân-
 cer 445
 veja também Drogas antiinflamatórias não-esteroi-
 dais (NSAIDs)
Drosophila melanogaster
 cromossômicos politénicos salivares 9F
 desenvolvimento do olho 165, 165F, 257F
 expressão embrionária de β -catenina 190F
 mutagênese 48
 splicing alternativo em 19B
 Duodeno, organização epitelial 236
- E**
- E2F, transcrição, fatores 279F
 apoptóticos 324
 bolso de ligação à proteína RB 279F, 280F, 302
 ciclo celular 281
 complexos Smad 290
 crescimento vs. quiescência 78-282
 desenvolvimento linfóide e 6B
 diferenciação celular e 293
 domínio de transativação 280
 efeitos de A-CDK2 em ciclina 281-282
 família de proteína 279F, 280
 genes ativados por 281
 indução da P53 e 316, 317-318
 indução de níveis de apoptose 65, 323-324, 324F,
 342
 indução Myc de 287
 ligação complexo de DNA 279F, 281
 proteína DP 279F, 280 dissociação 281-282
 repressão da transcrição de myc 290
 E-caderina
 associação com a catenina 190, 603-604
 associação com o citoesqueleto de actina 603-604
 fator de transcrição Slug e 616
 fator de transcrição Snail e 616
 genes supressores de metástase 644-645
 transição epitelial-mesenquimal *veja*
 transição epitelial-mesenquimal (EMT)
 Ectoderme 30, 30F
 Ectodomínios, EGF-R 127, 128F
 Efeitos antiangiogênicos, Herceptina 707-708
 Efeitos em alvos múltiplos, desenvolvimento de dro-
 gas 764-765
 Efeitos fora do alvo, desenvolvimento de drogas 745
 Efusões peritoneais 25F, 25B
 Efusões pleurais 25F, 25B
 EGF que se liga à heparina 532
 Elementos promotores 21, 22F
 expressão de ciclina D e 267
 metilação do DNA e 226-232, 228F, 229T, 297,
 412, 494
 análise 3F, 3B
 genes de reparo de pareamento errôneo 503-504,
 504F
 proto-oncogenes 103
 sítios de ligação a fatores de transcrição 281
 veja também Fatores de transcrição
 translocações cromossômicas e 109-110, 109F, 116
 veja também repressores
 viral 82, 83F
 Embolização, metástase e 28-29F, 28-29B
 Embriões de ouriço-do-mar, regulação do complexo
 ciclina-CDK 264-265
 Embriogênese *veja* desenvolvimento/embriogênese
 EMT *veja* Transição epitelial-mesenquimal (EMT)
 Endocitose, superexpressão de fator de crescimento e
 132B
 Endoderme 30, 30F
 Endogamia, perda de heterozigosidade e 218B
 Endostatina
 modelo de camundongo transgênico Rip-Tag 576
 supressão da angiogênese 572T, 573-574
 supressão de metástase 573-574
 terapia antiangiogênica 576, 578T
 Endotelina-1, metástase osteoblástica de osso 641
 Ensaio TRAP (protocolo de amplificação de repeti-
 ção telomérica) 376, 377F
 Ensaio TUNEL 7F, 7B, 331F
 Enterócitos
 funções 238
 migração para fora das criptas 238-239, 238F, 466,
 467F
 produção a partir de células-tronco 238, 238F, 329,
 466, 467F
 Envelhecer/envelhecimento

- encurtamento de telômeros 394-395, 395F, 395B, 396
 proliferação celular e 360, 361F, 361B
 reparo de DNA e 524
 risco de câncer de mama e 20-21F, 20B
 superexpressão de p53 e 5F, 5B
 taxas de câncer 395, 395B, 400-401, 400F, 401F, 402B
 Enxertos 70B
 alógenos, definição 671
 modelos de angiogênese 559-560, 561F
 modelos ectópicos vs. ortotópicos 538B
 Enzima de reparo Alk B 495-496, 495F
 Enzima desubiquitiladora (DUBs) 315
 Enzimas desalquiladoras 494-496, 495F
 quimioterapia e 523
 Enzimas do citocromo p450 (Cyps)
 ativação de carcinógenos/mutágenos pela 485-490, 486F
 variação individual 493B
 Eosinófilos, migração, cura de ferimentos 539
 Epidemiologia 56, 787, 788F
 associações históricas com o câncer 45-46
 câncer de pulmão 424B
 compostos carcinógenos 545
 efeitos da tumorigênese múltiplas etapas na 402B
 exposição a carcinógenos 403, 403F
 hepatite B e carcinoma hepatocelular 444B
 incidência ajustada à idade 402B
 obesidade e câncer 10F, 10B
 passagem de tempo da progressão tumoral 400-403, 401F, 402F, 403F
 veja também Incidência de câncer; Demografia
 Variação geográfica, Taxas de mortalidade
 xeroderma pigmentoso 499, 499F
 Epitélio 28-31
 arquitetura 29F
 cancerização de campo 16-175, 16F, 17F
 células secretoras 30
 células *veja* Células epiteliais
 crescimentos anormais (pré-malignos) 37, 39
 gastrointestinal 236, 238F, 403-407
 membrana basal *veja* Membrana basal, cânceres *veja*
 Cânceres epiteliais
 metilação do DNA 230F
 ocasionado pelo álcool 439
 origens no desenvolvimento 29-30, 30F
 reciclagem 404
 sinalização por NF- κ B na inflamação 446-447
 tumorigênese 528
 veja também tipos/localizações específicas
 Epitélio escamoso 31F
 metaplasia 37
 Epitélio gastrointestinal
 microanatomia 404F
 organização da 236, 238F
 progressão tumoral e 403-407
 reciclagem 404, 466
erbB2 (neu; HER2) veja Gene/proteína *HER2/neu*
 Erbitux (cetuximab) 708-7095, 709F
 Eritroblastoses 100
 Eritrócitos 32, 466
 Eritroleucemia 129, 134B
 Eritropoiese
 apoptose 329-330
 fator de transcrição HIF-1 e 24B
 Jaks (Janus cinases) 186
 regulação de SHP1 169B
 Eritropoietina (EPO)
 ativação de genes por HIF-1 245
 proteína gp55 e sinalização autócrina 134B
 receptor *veja* Receptor da eritropoietina (EPO)
 regulação de SHP1 169B
 Erks (cinases extracelulares reguladas por sinal) 199
 estrutura de ERK2 743F
 fosforilação pela MAPKK 175-176, 175F
 funções 176
 Erlotinib *veja* Tarceva
 Erógenos, promoção de tumor 440, 457
 Ervilhas, genética mendeliana 2, 3F
- Escada de DNA, apoptose 329, 330F
 Esclerose tuberosa, perda de TSC1/TSC2 786
 Escolha de cópia, mecanismo ALT 384
 Esôfago de Barrett 37, 394B, 411F
 “Espaço químico” 44F, 44B
 Espalhamento hematogênico, metástase 631-632
 Espécies reativas de oxigênio (ROS) 454
 catando de 491
 dano ao DNA 481-482, 483F, 524
 declínio na proliferação celular relacionado à idade 361B
 inflamação e 453, 482, 482B
 peroxissomos e 481
 processos mitocondriais 481
 radiação ionizante e 484
 taxa metabólica e 482, 484F
 Esqualeno esterol, terapia antiangiogênese 578T
 Estado eoplóide 11
 Estado pós-mitótico 255, 257, 292
 papel de CDK1 273, 273F, 293
 veja também Diferenciação celular
 vulnerabilidade a dano 465-466
 Estaurosporina, especificidade 746F
 Esterase D, ligação ao gene *Rb* 219-220, 220F
 Esteróides sexuais, como promotores de tumor 440-441, 441F, 457
 Estômago
 adenocarcinoma 31F
 câncer *veja* Câncer gástrico
 veja também entradas iniciando com *gastro/gástrico*
 Estoque viral 62
 Estratificação de pacientes, câncer de pulmão de células não-pequenas (NSCLC) 768
 Estratificação do câncer, arranjos de expressão gênica 728-729
 Estresse fisiológico
 apoptose intrínseca (ativada por estresse) *veja*
 Apoptose
 capacidade replicativa e 364, 365-366
 células em cultura 365, 365F
 papel da telomerase 381B
 papel de supressores tumorais 365-367, 365F, 366F
 como relógio “geracional” 364
 indução da p53 315-316, 329, 355
 progressão de tumor e 346-347, 350-351
 proteína Rb e relógio do ciclo celular 276
 veja também Proteínas de estresse
 Estrogênio(s), promoção de tumor 440-441, 457
 Estroma 28, 28F
 COX-2 e síntese de prostaglandinas 449-450, 450F
 perda da dependência de células de câncer do 25F, 25B
 sinalização por NF- κ B na inflamação 447
 transição epitelial-mesenquimal *veja* Transição epitelial-mesenquimal (EMT)
 tumores *veja* Estroma tumoral
 Estroma desmoplásico *veja* Estroma tumoral
 Estroma tumoral 528, 529F, 530, 547F
 adenocarcinoma gástrico 529F
 adipócitos 530
 alterações genotípicas 551, 553F
 áreas hipóxicas 556, 557F, 558F
 acumulação de fator induzível por hipóxia 558-559, 583
 necrose 556, 557F, 558F
 prognóstico vs. 582-583
 secreção do fator de crescimento vascular endotelial 558-559
 veja também Fator de transcrição HIF-1
 câncer de cólon 529F, 536F
 carcinoma ductal invasivo de mama 529F
 carcinoma lobular de mama *in situ* 529F
 carcinomas de células escamosas 530F
 células de músculo liso 530, 530F
 células endoteliais 530, 582
 células T 530F
 como remanescentes de tecido normal 531
- controle do 531
 estroma desmoplásico 545-547, 547F
 fibroblastos 530, 530F
 “estimulado pelo soro” 547-548, 549F
 recrutamento 547B
 fibrócitos 530F
 importância 582
 liberação do fator de crescimento semelhante à insulina 532
 linfócitos 530
 macrófagos *veja* Macrófagos associados a tumor (TAMs)
 mastócitos 530, 530F, 583
 metástases
 câncer de cólon 536F
 câncer de mama 536F
 veja também Metástases
 miofibroblastos 530, 545, 551
 arranjos de expressão gênica 549F
 recrutamento 547B
 recrutamento de precursor de células endoteliais 551, 552F, 558
 secreção de CXCL12 551
 monócitos 530F, 551-552, 554F, 583
 perda da dependência em 25F, 25B
 pericitos 530
 produção de interleucina-8 555
 secreção da proteína quimiotática de monócito 1 (MCP-1) 551-552
 secreção do fator estimulador de colônia de macrófago (M-CSF) 552
 suporte sanguíneo 556, 557F
 hipoxia *veja abaixo*
 nutrientes 556
 transição epitelial-mesenquimal *veja* Transição epitelial-mesenquimal (EMT)
 Estromelina-1 *veja* Metaloproteinase-3 de matriz (MMP-3)
 Estromelina-3 (metaloproteinase-11 de matriz; MMP-11) 564T
 Estrutura-alvo, desenvolvimento de drogas 744, 744F
 Estudos com gêmeos
 câncer de mama, menarca e 440
 mutações únicas e transformação 426F, 427, 427B
 Etanol (álcool), como promotor de tumor 439, 475B
 Etnicidade/raça, risco de câncer e 43-45
 mutantes de linhagem germinativa de *BRCA1/BRCA2* 23B
 sarcoma de Kaposi 88B
 veja também Fatores genéticos
Euplotes aediculatus, telomerase 14B, 378, 378F
 Evolução darwiniana
 alelos metastáticos 34B
 genética mendeliana e 4-7
 instabilidade genômica como 521
 sucessão clonal como 413-416, 414F, 461, 521
 células tumorais e 416-420, 420F
 fatores epigenéticos e 415, 423
 supersimplificação 420-423
 validação da 423-424
 Evolução
 comunicação intercelular 130B, 156
 darwiniana *veja* Evolução darwiniana
 famílias de genes 23F
 genética mendeliana e 4-7
 genoma humano 2B
 genomas virais 77-78, 78F, 78B, 79B
 instabilidade genômica e 517
 mecanismos de defesa (antitumor) 362-363, 399-400
 papel da mutação 4-5
 mutação neutra (silenciosa) 6-7, 6F
 proto-oncogene src 77F
 relógio do ciclo celular 301
 reparo de fotodano e 23B
 retrovírus endógeno 93
 seleção natural 5

- vias de sinalização 199, 200
- Éxons 18
- Expansão/sucessão clonal 42, 414, 414F
- cancerização de campo e 16F, 165
- diversificação e taxa de mutação 421-423, 421F, 518
- análise genômica comparativa 422-423, 423F
- análise por FISH 421-422, 422F
- consequências 423
- papel da inflamação 441
- perspectiva darwiniana 413-416, 414F, 461
- caminho linear como uma supersimplificação 420-423
- células-tronco tumorais e 416-420, 420F
- fatores epigenéticos e 415, 423
- validação da 423-424
- promoção de tumor e 452-453
- realidade no câncer 420-423
- Expectativa de vida
- divisão celular e risco de câncer 386-387, 433
- efeitos relacionados ao câncer na 401B
- Experimentos de transferência passiva, imunologia tumoral 672, 673F
- Exposição a asbestos, mesotelioma 67B
- Expressão gênica 16
- análises de microarranjos *veja* Arranjos de expressão gênica
- fenótipo e 19-21
- programa de 22
- regulação 21-22, 22F
- fatores de transcrição *veja* Fatores de transcrição
- promotores *veja* Elementos promotores
- repressores 144F, 279F, 280-281, 280F, 287
- veja também* controle transcricional
- veja também* RNA; Transcrição
- Extrações dentais, metástases e 33B
- Extravasação, metástase 594, 594F, 595F, 595B, 624, 653
- F**
- Fagocitose mediada por anticorpos 657-658, 658F
- Fagocitose
- corpos apoptóticos 330F
- macrófagos 658, 658F
- mediado por anticorpos 657-658, 658F
- Família de proteínas apenas BH3 338F, 339-340
- como alvo terapêutico 739, 740-741F
- Famílias de genes 23F, 23B
- Farmacocinética 750, 750F, 751
- Iressa 767, 767F
- Farmacodinâmica 750-751, 750F, 753F
- Farnesiltransferase 43F, 43B
- Fas ligante (FasL) 343, 344F
- imunoevasão 697-698, 699F
- mecanismos de assassinato por linfócitos T citotóxicos 665, 666-667F, 697
- testes, expressão em 689
- veja também* Receptor Fas
- Fase de leitura
- gene H-ras 106
- mutações *veja* Mutações com mudança de fase
- Fator 1 de crescimento semelhante à insulina (IGF-I)
- hiperinsulinemia, obesidade e câncer 10B
- liberação da matriz extracelular 555
- liberação das células estromais em carcinomas 532
- metástases de osso 640
- promoção de tumor 457
- receptor *veja* Receptor do fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-I R)
- sinalização heterotípica 531
- transição epitelial-mesenquimal (EMT) 609
- Fator 1 derivado de estroma (SDF-I) *veja* CXCL12
- Fator 2 de crescimento semelhante à insulina (IGF-2), sinalização heterotípica 531
- Fator de células-tronco (SCF) 140
- receptor *veja* Gene/proteína Kit
- Fator de crescimento de fibroblastos (FGF)
- cura de ferimentos 544F
- metástases de osso 640
- produção, fibroblastos 537
- proliferação de células epiteliais 537
- Fator de crescimento de fibroblastos básico (bFGF)
- angiogênese 559-560, 567T
- liberação por metaloproteínas da matriz 539
- ligação a células endoteliais 559
- supressão pelo interferon- α 576-577
- Fator de crescimento de fibroblastos ácido (aFGF), angiogênese 567T
- Fator de crescimento de hepatócito (HGF/SF)
- angiogênese 567T
- liberação, células estromais de câncer de mama 532
- motilidade celular e metástase 613F, 614F, 625
- receptor *veja* Gene/proteína *met*
- sinalização heterotípica 531, 531F
- transição epitelial-mesenquimal (EMT) 31B, 609, 614, 614F
- troca de E-caderina para N-caderina 604
- Fator de crescimento de nervo (NGF)
- ativação de fosfatidilinositol 3-cinase 178
- receptores *veja* Receptores Trk
- Fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF)
- angiogênese 560, 567T
- armazenamento/liberação pelas plaquetas 122, 122F
- ativação de fosfatidilinositol-3 cinase 178
- ativação pela HIF1 245, 246
- células endoteliais 532
- células epiteliais em estroma tumoral 532
- cura de ferimentos 537, 544F
- estimulação de fibroblastos 122, 123F
- funções 132
- homologia Sis 132, 157
- indução, fator induzido por hipóxia 1 583
- metaloproteínas de matriz 539
- migração de fibroblastos 538
- no câncer 532, 544
- receptor *veja* Receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF-R)
- recrutamento de perícitos 535B
- sinalização heterotípica 531, 531F, 544
- transdução de sinal, domínio SH2 e 168, 168F
- veja também* Gene/proteína *sis*
- Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)
- angiogênese 567T
- animais *knock-out* 566-567
- ativação pela HIF-1 244F, 245, 246F
- câncer de mama *veja* Câncer de mama
- células tumorais 559
- cura de ferimentos 544F
- estimulação pós-cirurgia 548B
- estroma tumoral 552, 558-559
- macrófagos associados a tumor (TAMs) 553, 554F
- mieloma múltiplo 775
- mioblastos 559
- modelo de camundongo Rip-Tag 565
- perícitos 532
- permeabilidade de capilares 563B
- produção de macrófago 559, 684
- prognóstico e 569, 569F
- receptores 559
- Flt-1 129F, 138F, 138B
- recrutamento de monócitos 552
- recrutamento de precursores de células endoteliais 570-571
- vazamento de microvasos e terapia anti-VEGF 26B, 27F
- VEGF-C e linfangiogênese 632
- Fator de crescimento epidermal (EGF) 111, 127, 128, 157
- efeitos em células de câncer 123F
- motilidade celular, metástase e 630-631, 630F
- receptor *veja* Receptor do fator de crescimento epidermal (EGF-R)
- secreção por macrófagos associados ao tumor 555-556
- transição epitelial-mesenquimal 31B, 609, 612-614
- Fator de crescimento placentário (PGF), angiogênese 567T
- Fator de crescimento transformante α (TGF- α)
- angiogênese 567T
- ativação por HIF-1 245, 246
- aumento ativado 155, 155F
- indução, fator induzível por hipóxia 1 583
- sinalização autócrina 155
- sinalização heterotípica 531
- Fator de crescimento transformante β (TGF- β) 143, 194F, 197, 206
- angiogênese 559-560, 567T
- apoptose de células dendríticas 698
- apoptose de macrófago 698
- células T regulatórias (T_{reg}) 669
- colaboração com a Ras 609
- como contrabalanço de Myc 290-292, 291F
- cura de ferimentos 537, 544F
- desregulação no câncer 30B, 195F, 290-292
- independência de ancoragem e 4B
- metástases de osso 640
- diferenciação celular e 288
- efeitos antitumor 30B
- expressão de E-caderina 609
- expressão de fator de transcrição 616
- funções imunossupressoras 698, 700, 700F
- imunoevasão 698
- indução de miofibroblastos 545
- inibição da via de pRb 611
- metaloproteínas de matriz e 539
- metástases de osso osteolítico 642F, 642B
- propriedades inibitórias de crescimento 30B, 255, 257, 270F
- indução de CDK1 268-269, 269F, 289
- inibição por Myc 287, 289-290
- prevenção da fosforilação de RB 288-292
- receptor *veja* Receptor do fator de crescimento transformante β
- sinalização heterotípica 531
- transição epitelial-mesenquimal (EMI) 30B, 31B, 609-611, 610F, 614
- Fator de espalhamento (SF) *veja* Fator de crescimento de hepatócito/fator de espalhamento (HGF/SF)
- Fator de iniciação da tradução eIF4E, ativação 176
- Fator de necrose tumoral α (TNF- α)
- angiogênese 567T
- estimulação, NF-kB 611
- estrutura 344F
- indução por NF- κ B 445, 451F, 611
- ligante de receptor de morte 343
- mediador inflamatório 445, 451F
- transição epitelial-mesenquimal 31B, 609, 611, 614
- Fator de permeabilidade vascular (VPF) *veja* Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)
- Fator de crescimento AP-1 176
- ativação pela PKC- α 439F, 451F
- expressão da ciclina D1 267, 283
- Fator de transcrição C/EBP β 267B, 293
- Fator de transcrição E47/E2A, transição epitelial-mesenquimal 616T
- Fator de transcrição Ets, Fosforilação pelas Erks 176
- Fator de transcrição Gil 196, 206, 777, 778-779F
- Fator de transcrição Goosecoid, transição epitelial-mesenquimal (EMT) 616, 616T
- Fator de transcrição HIF-1 583
- acumulação de estroma tumoral 558-559
- ativação constitutiva em células de câncer 246
- eritropoiese e angiogênese 244F, 245
- genes ativados por 244F, 245, 246F, 583
- parada, supressão da angiogênese 571
- regulação por VHL 241, 244-245, 244F, 245F
- subunidade α 241, 244
- hipoxia e 244-245
- oxidação da prolina 244F, 245
- subunidade β 244
- Fator de transcrição Sipl 616-617, 616T, 617F, 619F
- Fator de transcrição Slug 615-616, 616T, 618F, 619F
- Fator de transcrição Snail 615-616, 616F, 616T, 619F
- Fator de transcrição Tcf/Lef 189, 190, 238F, 239, 267

- Fator de transcrição Twist 603F, 615-616, 616T, 619F, 620F
 câncer de mama 616, 617F
 carcinomas gástricos 616
 gastrulação 616
 resistência à apoptose 617
- Fator estimulador de colônia 1 (CSF-1), indução da ciclina D1 266F
- Fator estimulador de colônia de granulócito (G-CSF), angiogênese 567T
- Fator estimulador de colônia de granulócito-macrófago (GM-CSF), ativação de células dendríticas 714
- Fator estimulante de colônia de macrófago (M-CSF), secreção do estroma tumoral 552
- Fator induzido por hipóxia 1 (HIF-1) *veja* HIF-1 fator de transcrição
- Fator nuclear-κB (NF-κB) 193, 194F, 195, 206
 antagonistas 777
 desregulação no câncer 195F, 348
 linfomas 730, 731F, 777
 mielomas múltiplos 774, 774F, 775F
- estrutura 193
 expressão de interleucina-4 775
 expressão interleucina-6 775
- genes-alvo 348, 451F
 ciclina D1 (*CCND1*) 267
 Cox-2 448
 TNF-α 445-446, 611
- sinalização pela proteína de fusão Bcr-Abl 759
- transição epitelial-mesenquimal (EMT) 611, 611F
- via de sinalização 451F
 ativação por PKC-α induzida por TPA 439F
 inflamação e 445-447, 447F
- Fator tecidual, embolização e metástase 28-29F, 28B
- Fator(es) de crescimento 119-158
 câncer de osso em câncer de mama 640
 ciclo celular 255
 como mitógenos 122
 como oncoproteínas 132-135, 197
veja também Sinalização autócrina
- definição 121
 efeitos nas células 123F
 estrutura dimérica 136
 interações com receptores 136-137, 137F, 138F, 138B
 ligação e liberação da ECM 145B
 patogênese tumoral e 129T
 receptores *veja* Receptor(es) de fator de crescimento
- respostas diversas a 163-164, 163F
 proteínas com domínios SH2 e 168-169
veja também Comunicação intracelular
- tumorigênese retroviral 84
veja também fatores de crescimento específicos
- Fatores ambientais 43-44, 47T
 carcinógenos químicos *veja* Fatores carcinógenos
- fatores genéticos vs. 44
 ocupacionais 45-46
- Fatores de transcrição 21-22, 22F
 ativação por proteínas de sinalização intracelular 162, 201
 como alvos proteicos não-potenciais para o desenvolvimento de drogas 737-738
- genes de início imediato 162
 motivos de ligação ao DNA 21
 oncoproteínas e 289B, 289I
 pleiotropia 21
 regulação 314
 transição epitelial-mesenquimal *veja* Transição epitelial-mesenquimal (EMI)
- veja também* fatores de transcrição específicos
- Fatores de transcrição hélice-volta-hélice (bHLH) 285
 inibição 300
 Myc *veja* proteína Myc
- papel na diferenciação celular 285, 294, 295F
- Fatores epigenéticos
 câncer colorretal 408, 412
 inativação do X *veja* Inativação do X
- metástase 649-650
 metilação *veja* Metilação do DNA, tumorigênese 399, 408, 412, 435
 seleção darwiniana e 415, 423
- Fatores estimuladores de colônia (CSFs)
 ativação de células dendríticas 714
 indução da ciclina D1 266F
 secreção do estroma-tumoral 552
 transição epitelial-mesenquimal 611-612, 612-614, 612F, 613F
- Fatores genéticos
 BRCA1/BRCA2 e câncer de mama/ovário 505, 509, 522
 defeitos no reparo de DNA 24F, 24B, 505-509, 519
 diferenças na população 43
 metástase 649-650, 651F, 651B
 polimorfismo *Mdm2* e suscetibilidade ao câncer 8B
veja também Etnicidade/raça, risco de câncer e; Síndromes familiares de câncer; Polimorfismo
- Fatores no estilo de vida 45-46, 47T
Veja também fatores específicos
- Fatores trocadores do nucleotídeo guanina *veja* GEFs (fatores trocadores do nucleotídeo guanina)
- Fatores tróficos
 interações heterotípicas, tumorigênese 531, 531F
 sobrevivência vs. apoptose 345-346
veja também fatores específicos
- Fenobarbital, teste de Ames 54B
- Fenocópias, ação de oncogenes 451-452
- Fenótipo
 celular, efeitos de vírus tumoral 69-71, 69F
 dominância incompleta e 5F
 genótipo e *veja* Correlações genótipo-fenótipo
- padrões de expressão gênica e 19-21
 trabalho de Mendel 3
- Feocromocitoma 233, 241
- Fertilização 9
- Fibiger, Johannes Grib 60-61
- Fibroblasto(s) 31
 carcinoma ductal *in situ* de mama (DCIS) 530F
 cura de ferimentos 537, 540F
 efeitos do PDGF 122, 123F, 538
 estimulação por tumor enxertado 546F, 549-550, 550F, 551F
 estroma tumoral *veja* Estroma tumoral
- expressão de E-caderina 604, 605F
 FGF produção 537
 inativação do receptor de TGF-β, tumorigênese 548, 550F
 interações heterotípicas na tumorigênese 544, 545F, 584F
 metaloproteinase-9 de matriz (MMP-9) 622
 senescentes 360F
- “Fibroblastos associados a tumor” (CAF) 547
- Fibroblastos de embrião de rato (REFs), experimentos de transformação 427, 430B
- Fibrócitos, estroma tumoral 530F
- Fibronectina
 estroma desmoplásico 546
 substrato da metaloproteinase de matriz 622
- Cancerização de campo 16-175, 16F, 17F, 413
 transição epitelial mesenquimal (EMT) 543F, 603F
- Fígado
 ativação de pró-carcinógenos 50, 53
 câncer *veja* Câncer no fígado
- inativação de mutágenos *veja também* entradas que possuam hepato/hepático
- Filopodia
 GTPase Rho e 182
 motilidade celular, metástase 625, 627, 627F
 Ral GEF 184F
- FLIP (proteína inibitória FLICE) 349
- Flora gastrointestinal, metabolismo de xenobióticos 22B
- Focos heterocromáticos associados à senescência (SAHF)s 12-13F 12B
- Forbol-1 2-miristato-i 3-acetato (PMA) *veja* TPA (12-O-tetradecanoilforbol-1 3-acetato)
- Forma celular 163, 1631 182
- Formação da fosfotirosina 136F, 166-171
- Formação de fibrina, tumorigênese 544, 545F
- Formação de sincícios, fusão celular 210
- Forquilha de replicação 479, 480F, 505
veja também Quebras dupla-fita (DSBs)
- Fosfatase(s)
 proteína SHP1 167
 regulação de cinase 180
veja também enzimas específicas
- Fosfatidilinositol (3,4,5) trifosfato (PIP₃) 46B, 177, 178F, 199
 ligação ao domínio PH 179, 179F, 180F
- Fosfatidilinositol (4,5) difosfato (PIP₂) 177, 178F
- Fosfatidilinositol (P1) 177, 178F, 179
- Fosfatidilinositol 3-cinase (P13K) 177, 199, 205
 ativação pela ligação a Ras 178, 179F
 ciclo celular e 170-171, 170F, 181, 181T, 284
 controle da 180
 desregulação no câncer 46B, 182-183, 183T, 199, 300, 347-348, 410
 domínio SH2 167, 168, 169-170, 178
 estrutura 205F
 receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF-R) 628-629
- regulação da p53 pela Mdm2 e 320-321F, 321
- regulação pela Akt/PKB 46B, 179-180, 180F
- sinalização pela proteína de fusão Bcr-Abl 759
- via de sinalização 177F, 178
- Fosfatidilserina (PS), detecção da apoptose 7F, 7B
- Fosfolipase C (PLC)
 domínio SH2 167, 168
 sinalização por GPCR 191, 191F
- Fosfolípido(s)
 como segundos mensageiros 176-183, 177F
 membrana plasmática 176-177
veja também tipos específicos
- Fosfoproteínas 124
- Fosforilação 19B
 cinases dependentes de ciclina 274B
 degradação e 242B
 efeitos estereotópicos da 166
 regulação da p53 319-320, 320-321F, 351-352
veja também Proteínas cinase(s)
- Fosforilação da 4E-BP1, mTOR 784-785F
- Fosforilação da p70B6 cinase, mTOR 784-785F
- Fosfotirosina fosfatase (PTP), domínio SH2 169B
- Fotoprodutos de DNA 484, 485F
 sistemas de reparo 235
veja também Reparo por excisão de nucleotídeos (NER); Irradiação ultravioleta B (UVB)
- FOXC2, transição epitelial-mesenquimal (EMT) 61 6T
- 5-Fluorouracil (5-FU), efeito na indução de câncer de pele em camundongos 467-468
- Fragmentos de restrição telomérica (TRFs) 370F
- Fronteiras do carcinoma, transição mesenquimal-epitelial 601, 602F, 650
- Fumagilina, terapia antiangiogênese 577
- Fumar cigarros *veja* Tabagismo
- Fusão celular *veja* Células híbridas
- Fusão gênica 112, 114T, 116, 525
bcr-abl *veja* Cromossomo Filadélfia
- dimerização de receptor independente de ligante 139, 139F, 157
- eliminação de ARF e 6B
veja também Proteínas de fusão; *moléculas específicas*
- Fuso mitótico 258F
- multipolar 515F
- segregação e 513, 514F, 515F

G

- GAGE-2, antígeno de transplantação associado a tumor 689
- GAGE-I, antígeno de transplantação associado a tumor 689
- Galinha(s)
 como modelos animais de câncer humano 355
 vírus do sarcoma de Rous (RSV) 58-61, 59F

- Gangliosídeos, imunologia tumoral 683
 GAPs (proteína ativadora de GTPase) 134, 152, 152B, 182B
 Gastrulação 600-601, 616
 Gefitinib *veja* Iressa
 GEFs (fatores de troca de nucleotídeos guanina) 182B
 domínio PH e ligação de PIP₃ 181, 205
 gene/proteína sos 165
 metástase 629
 motilidade celular e metástase 629
 sinalização da Ras 151F, 152, 204
 RAL-GEFs e 183-184
 Gelatinase A *veja* Metaloproteinase de matriz 2 (MMP-2)
 Gelatinase B *veja* Metaloproteinase de matriz 9 (MMP-9)
 Gemcitabina 754, 755F
 Gene *AID* 225
 Gene *AML1* (*Runx1*), 65, 225T
 Gene *CTGF* (fator de crescimento do tecido conjuntivo), metástases 651F
 Gene *CXCR4* 651F
 Gene da polipose adenomatosa coli (APC) *veja* gene/proteína *Apc*
 Gene *DAPK*, metilação de promotor 229T
 Gene *Dmpl* haploinsuficiência 236B
 Gene do receptor PTCH (patched)
 holoprosencefalia 777
 mutações no câncer 196, 779-780
 Gene *DPC* 225T
 Gene *env* 62F, 76F
 Gene *erbA*, malignidades hematopoiéticas 470B
 Gene *ETO*, fusão gênica e eliminação de ARF 6B
 Gene *gag* 62F, 76F
 Gene *KAI1/CD82*, supressor de metástase 643T, 644
 Gene *MMPI* (metaloproteinase-1 de matriz), metástases 651F
 Gene *MSH2*, mutação em HNPCC 501-502
 Gene *OPN* (osteopontina), metástases 651F
 Gene *p53* 225T, 232, 249-250, 304, 307-356
 animais *knock-out* 310
 deficiência na telomerase 390
 como gene supressor de tumor 310-311, 310F
 em células-tronco embrionárias 261B
 envelhecimento e 5F, 5B
 mutação/perda de função 317, 326, 354, 517-518, 519
 acumulação de dano no DNA e 329, 332
 alelos nulos 312
 aneuploidia e 515
 câncer de pulmão e 487F, 490
 cancerização de campo 16-17B, 17F
 ciclos BFB e regeneração dos telômeros 390-391, 392F
 desenvolvimento 310-311, 311F
 efeitos antiapoptóticos 347
 eliminação de ARF como uma alternativa para 6B
 fotoprodutos do DNA 484
 frequência em tumores humanos 311F
 função da proteína 311-314
 HCC e 488
 imunologia tumoral 681
 linhagem germinativa 332-333, 333F, 333B
 mutações dominante-negativas 312, 314F, 315B, 350
 mutações pontuais 310, 313F, 326, 333, 350
 mutações sem sentido 312
 natureza do 313F
 necessidade para transformação 433
 perda de heterozigiosidade 313
 pressão seletiva 392
 progressão tumoral múltiplas etapas 16-17B, 17F, 321-322
 síndromes herdadas de câncer 332-333, 333F, 333B
 terapia do câncer 351
 vantagem obtida por 329, 331-332
 vírus de DNA e 18B
 polimorfismos ocorrendo naturalmente 5F, 5B
 terapia com drogas e 42F, 42B
 proteína codificada *veja* Proteína p53
 risco evolucionário e 323B, 350
 superexpressão 5F, 5B
 Gene *pol* 62F, 76F
 Gene *PTC* *veja* Gene do receptor PTCH (patched)
 Gene *Rb* (retinoblastoma) 225T, 249-250, 255-306
 clonagem 219, 274
 hipometilação do promotor 229T
knock-outs de camundongo 249, 252F
 ligação a E2F 278, 279F
 localização cromossômica 219, 219F
 mutação/perda de função 221F, 288, 297
 alelos nulos 221
 cinética de segunda ordem vs. primeira ordem 215-216, 216F
 consequências no ciclo celular 278
 deleções 221
 deleções intersticiais 219
 dominância em nível de organismo 217B
 duplicação de centrôssomos e 514-515
 especificidade de tecido 522
 metilação do promotor 297
 osteossarcoma e 214, 221
 perda de heterozigiosidade 25, 217-218, 217F, 219-221, 219F, 220F
 recessividade em nível celular 217B
 retinoblastoma e 214-216, 215F, 216F
 submicroscópico 219
 vírus de DNA e 18B
 produto proteico *veja* Proteína RB (retinoblastoma)
 Gene *SHH* *veja* Hedgehog sônico (*SHH*)
 Gene *SUFU* 196
 Gene *TIMP3*, metilação de promotor 229T
 Gene *Tip53* *veja* Gene *p53*
 Gene(s) *caretaker* 226, 247, 253, 517
 BRCA1/BRCA2 505
 metilação do DNA e 231
 números no genoma 522
veja também DNA, manutenção; reparo de DNA
 gene/proteína
 Gene(s) *gatekeeper* *veja* Genes supressores de tumor (TSGs)
 Gene(s) *myc*
 ativação de Jak-STAT 185-186
 ativação oncogênica 107-111, 116
 amplificação gênica 100, 107, 107F, 107B, 108, 116
 expressão constitutiva 291
 frequência 284
 mutagênese insercional 82-84, 83F, 85B, 86, 108
 por promotor retroviral 103
 translocações cromossômicas 109-110, 109F, 116, 511
 celular (*c-myc*) 81
 ativação oncogênica *veja* Ativação de oncogene
 controle transcricional 103, 290, 291F
 indução por mitógenos 162
 co-ativação/colaboração 427, 429T
bcl-2 e 335F, 430
 experimentos com animais transgênicos 430, 431F
 experimentos de co-transfecção 427-428, 428F
 como gene de início imediato 162
 L-*myc* 108, 296T, 300
 N-*myc* 107, 296T, 300
 expressão de Id2 e 295
 neuroblastomas 107F, 107B, 349, 383B
 notação/terminologia 108
 proteína codificada *veja* Proteína Myc
 viral (*v-myc*) 80107
 Gene(s) *ras*
 H-*ras*
 câncer de pele 437
 melanoma, modelos animais 736-737, 736T
 mutações na linhagem germinativa 142B, 427
 mutações pontuais 105-106, 105F, 106T, 114, 116
 oncogene celular 99, 99F, 103
 oncogene viral 80
 oncogenicidade 105-106, 105F, 106T, 114, 116
 proto-oncogene 103
 síndrome de Costello 145B
 transformação pela 96-98, 96F, 98F, 424, 425
 vantagem seletiva 437
 mutações colaborativas 429T
 experimentos com animais transgênicos 430, 431F
 experimentos de co-transfecção 427-428, 428F
 mutações pontuais e oncogenicidade 106, 106T, 114, 116, 198
 frequência 424
 mutações específicas induzidas por carcinógenos 439B
 sítios específicos 152-153, 153F, 158
 proteínas codificadas *veja* Proteína(s) *Ras*
splicing alternativo 151
 Gene(s) *src*
 câncer colorretal e 101
 proteína codificada *veja* Proteína *Src*
 proto-oncogene celular (*c-src*) 75-50, 86, 89
 árvore evolutiva 77F
 estrutura 79
 transformação oncogênica 78-79
 sondas de DNA 75, 76F, 76B
 Gene(s)
 amplificação *veja* Amplificação gênica
caretakers 226, 231, 247, 253, 505, 517, 522
 causadores de câncer 91-115
 busca por 93-94
 oncogene(s) *veja* Oncogene(s)
veja também Fatores genéticos; Proto-oncogene(s);
 Genes supressores de tumor (TSGs)
 clonagem *veja* Clones/clonagem
 conservação evolutiva 8B, 22, 23B
 estrutura
 seqüências codificadoras 6, 6F, 21
 seqüências-controle de 21, 22F
veja também Elementos promotores; controle transcricional
 éxons 18
 expressão *veja* Expressão gênica
gatekeepers *veja* Genes supressores de tumor (TSGs)
 genética mendeliana e comportamento 7-10
 homólogos 23B
housekeeping 21
 idéia de Mendel 2-3, 3F
 interações 4
 íntrons 18, 18F
 localização (loco genético) 8, 9F
 mutação *veja* Mutação(s)
 ortólogo 23B
 tamanho, LOH vs. mutação secundária 2B
 tecido-específicos 21
veja também Cromossomo(s); DNA; genes específicos
 Gene/produto *bTR* 377, 378, 381
 associação com disquerina 388B
 homólogo em camundongo (*mTR*) 387
veja também Camundongo *knock-out mTR* (*mTR^{-/-}*)
 Gene/proteína 12-13F, 12B, 523F, 523B
 Gene/proteína *APAF1* 229T, 324, 347
 Gene/proteína *Apc* 225T, 235-241
 análise de junções 237F, 237B
 clonagem 236, 237B
 complexo multiprotéico da β -catenina 189-190, 238F, 239, 240F, 4125
 inativação da *Apc* e 239-241
 estrutura multidomínios 240F
 inativação em câncer colorretal 223, 223F, 235-236, 410
 CIN e 241
 COX-2 e 4-48
 mutações vistas 240F
 organização colônica da cripta e 239-241, 4125
 mecanismos moleculares de ação 239
 metilação do DNA e 229T, 240
 migração de enterócitos para fora das criptas 238-239, 238F
 perda de heterozigiosidade 223, 223F, 409, 409F
 polipose adenomatosa familiar 236, 407, 413
 tipos de mutações 313F

- Gene/proteína Bax
efeitos pró-apoptóticos 337, 338, 343, 347
estrutura 338F
família 338F
mutação/perda de função 347
defeitos MMR e 504
- Gene/proteína *Bcl-2*
como oncogene 334, 336, 347
efeitos antiapoptóticos 334-335, 335F, 336-340, 337, 339F, 345, 355
myc e 335F, 430
estrutura 338F
família de proteínas 337, 338F
inibidores 739, 740-741t
interações com a proteína BH3, como alvo terapêutico 739, 740-741F
translocação cromossômica 334
veja também Apoptose; genes/proteínas relacionadas
- Gene/proteína *BECN1* 225T
- Gene/proteína *BHD* 225T
- Gene/proteína Bm1 inibição de ARF 65
- Gene/proteína *BMPRI* 225T
- Gene/proteína *BWS/CDCKNIC* 225T
- Gene/proteína *CBP* 225T, 740-741F
- Gene/proteína *CDH1* 225T
câncer gástrico familiar 604
genes supressores de metástase 643T
metilação de promotor 229T
transição epitelial-mesênquimal (EMT) 604
- Gene/proteína *CHFR*, controle do ponto de verificação da mitose 516-517
- Gene/proteína *CYLD* 225T
- Gene/proteína *erbB* 100, 129-131
homologia com EGF-R 129, 130F, 157
malignidades hematopoiéticas 470B
rede de sinalização 120F, 150
sinalização celular independente de ligante 130-131, 131F
veja também Receptor do fator de crescimento epidermal (EGF-R)
- Gene/proteína *FH/T* 225T
- Gene/proteína *fos*
ativação pela PKC- α 439F, 451F
como gene de início imediato 162
como oncoproteína 289B
formação de AP-1 176
indução pela via da Raf cinase 176
- Gene/proteína *FU* 225T
- Gene/proteína *GSTM1* 491-492, 493B
- Gene/proteína *GSTP1* 229T
- Gene/proteína *GSTT1* 491-492, 493B
- Gene/proteína *hCOC4* 225T
- Gene/proteína *HER2/neu*
amplificação de genes 100-101, 101F, 102F, 102B, 116
consequências fenotípicas 156
câncer de mama 100-101, 101F, 102B, 683, 705
prognóstico 569, 569F
clivagem pós-traducional 707
dimerização de receptor independente de ligante 138-139
imunologia tumoral 683
internalização, Herceptina 40B, 707
propriedades antiapoptóticas 707
- Gene/proteína H-ras *veja* Gene(s) *ras*
- Gene/proteína *HRPT2* 225T
- Gene/proteína *hTERT* 377, 378, 378F, 379F
como alvo terapêutico 385-386
expressão (*de-repression*) em câncer 378-380, 392, 397
câncer de fígado 683
mutantes dominante-negativos 381-382, 382F
homólogo em camundongo (mTERT) 386, 386B
imortalização e 378-380, 379F, 380B, 396, 432
experimentos com hTERT mutante 381-382
experimentos de transfecção de cDNA 378, 380F
imunologia tumoral e 683
regulação da expressão 379B
- Gene/proteína *IGFBP* (proteína de ligação a IGF) 10B, 229T
- Gene/proteína *jun*
ativação pela PKC- α 439F, 451F
como gene de início imediato 162
como oncoproteína 289B
formação de AP-1 176
indução pela via da Raf cinase 176
sinalização pela proteína de fusão Bcr-Abl 759
- Gene/proteína *kit*
ações de Gleevec 759, 762-764
GISTs 140B, 142F, 142B, 426-427
mutações 140-141F, 140B, 426
NF1 e 235
regiões justamembrana 140B
sinalização autócrina 133-134
tumores de estroma gastrointestinal (GISTs) 762-764
- Gene/proteína K-ras *veja em* Gene(s) *ras*
- Gene/proteína *LKB1/STK11* 225T
- Gene/proteína *Mdm2*
antagonismo da p53 e 318-323, 319F, 320-321F, 323B, 326
como alvo terapêutico 739, 740-741F
camundongos *knock-out* 323B
como oncoproteína 320, 332
mutações na linhagem germinativa 333
polimorfismo e suscetibilidade ao câncer 8B
regulação 320-321, 320-321F
ARF (p14ARF/p19ARF) 321-323, 322F
circuito de retroalimentação 326
inativação pela ATM cinase 320
proteínas relacionadas 8B
translocação para o núcleo 321
veja também Proteína p53
- Gene/proteína *mdmX* (*mdm4*) 8B
- Gene/proteína *MEN1* 225T
regulação de hTERT 380B
- Gene/proteína met
dimerização e independência de ligante 137-138, 139, 139F
indução, fator induzível por hipóxia 1 583
mutações na linhagem germinativa 142B
transição epitelial-mesênquimal (EMT) 583
- Gene/proteína *MGMT* 494-495, 495F
eficácia da quimioterapia 494, 523
especificidade tecidual 496B
hipometilação 229T, 494
- Gene/proteína *MLH1*
mutação em HNPCC 501-502
resistência à alquilação e 504
silenciamento 229T, 503-504, 504F
- Gene/proteína *mTERT* 386, 386B
- Gene/proteína neu *veja* Gene/proteína *HER2/neu*
- Gene/proteína *NF2* 225T
- Gene/proteína *NF1* 225T, haploinsuficiência 225T, 233-235
função da proteína (neurofibromina) 234
perda de heterozigose 235, 247
sinalização por Ras e 234, 235F
- Gene/proteína *NKX3.1* 225T
- Gene/proteína *NM23*, supressão de metástase 643-644, 643T
- Gene/proteína N-ras *veja em* Gene(s) *ras*
- Gene/proteína P14^{arf} (ARF humana) 225T, 321
metilação do DNA 6B, 229T
mutação/perda 6B, 323
risco evolutivo e 323B
sítio de reconhecimento de E2F 324
veja também Gene/proteína P19^{arf} (ARF de camundongos)
- Gene/proteína p15^{ink4B} 232, 268
ações 268
hipometilação 229T
indução por TGF- β 268, 269F, 270F, 289
repressão mediada por Myc 287
bloqueio da ciclina D - formação de CDK4/6 268
- Gene/proteína p16^{ink4A} 225T, 232, 268
ações 269F
alterações em tecidos histologicamente normais 17B
alterações no câncer 297T, 298, 323
camundongos *knock-out* 390
metilação do DNA 229T, 230, 298
papel na senescência celular 365-366, 365F, 366F
risco evolutivo e 323B
splicing alternativo (p14/19^{arf}) 321F
- Gene/proteína p18^{ink4A} 268
- Gene/proteína p19^{ink4A} (ARF de camundongos) 232, 321
knock-outs 390
risco evolutivo e 323B
veja também Gene/proteína P14^{arf} (ARF humana)
- Gene/proteína P19^{ink4B} 268
- Gene/proteína p27^{Kip1} 268
ações 269F, 270F
diferenciação e 293
na ciclina D-CDK4/6 271-272
na ciclina E-CDK2 272, 273, 281
ponto R e 272-273
alterações no câncer 297T, 298-300
níveis de Skp2 e 299-300, 299F
Fosforilação pela Akt/PKB 270F, 271, 271F
haploinsuficiência 236B
localização celular e progressão do câncer 271, 271F
ubiquitilação/degradação 281, 284
papel de Myc 287
- Gene/proteína p57^{Kip2} 229T, 268, 269F
- Gene/proteína p63 8B
- Gene/proteína p73 8B, 229T, 324
- Gene/proteína *PRKARIA* 225T
- Gene/proteína *PTEN* 225T
Akt/PKB e 252
controle pela PI3K 180, 199, 205
desregulação no câncer 183, 183T, 199, 300, 348
haploinsuficiência 236B
perda/inativação 46B, 252
tumores Iressa e PIEN-negativos 768
- Gene/proteína *RASSF1A* 225T, 228F
- Gene/proteína ret, síndromes familiares de câncer 142B
- Gene/proteína *Runx3* 225T, 229, 248
- Gene/proteína *Runx1* 6B, 225T
- Gene/proteína *SDHD* 225T
- Gene/proteína *sevenless* 165, 165F
veja também Receptor do fator de crescimento epidermal (EGF-R)
- Gene/proteína sis 132-135
especificidade de tipo celular 133
homologia com PDGF 132, 157
sinalização autócrina 133-135
veja também Fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF)
via de sinalização 150
- Gene/proteína Smad 4 (*DPC4/MADH4*) 289
haploinsuficiência 236B
inativação no câncer 292
papel na função Myc/TGF- β 291F
provável supressor de tumor 410
- Gene/proteína *SNF5* 225T
- Gene/proteína sos 165
estrutura 205F
via de sinalização 165, 165F, 204-205
sinalização com integrina 188
veja também Sinalização pela Ras
- Gene/proteína *TGFBR2* 225T, 229T
- Gene/proteína *THS1*, hipometilação 229T
- Gene/proteína *TP53* *veja* gene *p53*
- Gene/proteína *TSC1* 225T, 257F, 786
- Gene/proteína *TSC2* 180, 225T, 786
- Gene/proteína *TSP-1* 332, 571-572, 572, 573F
- Gene/proteína Tuberina *veja* Gene/proteína *TSC2*
- Gene/proteína *VHL* 225T, 241, 244-246
complexo de proteínas 245, 245F
HIF1 e 241, 244-245, 244F, 245F
mutações na linhagem germinativa 241, 246B
perda de heterozigose 241
policitemia familiar 246B
síndrome de Von Hippel-Lindau 241, 244F, 246
- Gene/proteína *WT1* 225T
- Genes controladores do crescimento
efeitos mutagênicos 93
genes anticrescimento *veja* Genes supressores de tumor (TSGs)

- metilação 230
 promoção do crescimento *veja* Proto-oncogene(s)
 sítios de ligação a E2F 281
veja também Relógio do ciclo celular, *genes específicos*
- Genes de início atrasado 162, 164B
 Genes de início imediato (IEGs) 161
 fatores de transcrição 289B
 genes de início tardio vs. 163F
 indução da expressão 161, 161F
 em células de câncer 164B
 pela via da Raf cinase 176
 proteínas codificadas por 162, 162T
veja também genes/proteínas específicos
- Genes de suscetibilidade *veja* Fatores genéticos
- Genes Housekeeping 21
- Genes supressores de tumor (TSGs) 209-255, 225T
 caso contra a existência 213
 funções da proteína 224, 225T, 232-233, 249, 253
 haploinsuficiência 235, 236B, 247
 identificação
 animais transgênicos 249, 250-251F, 252F
 critérios 247-248
 experimentos de fusão celular 210-213, 211F, 212F
 perda da heterozigotidade e 221-223, 222F, 223F, 248
 testes funcionais 248
 validação 249
- mutação/perda/inativação 216-218, 253
 hipótese de segunda ordem 213, 215-216, 216F, 247, 312, 415
 linhagem germinativa 226F
 LOH vs. mutação secundária 2B
 metilação do promotor 226-232, 229T, 230F, 231F, 248, 298
 mutação somática 213, 215, 216F
 natureza recessiva 213
 perda de heterozigotidade *veja* Perda de heterozigotidade (LOH)
 síndromes familiares de câncer 224, 226, 247
 tratamento com drogas e 252
- p53 *veja* Gene p53
 papel na senescência celular 365-367, 365F, 366F
 regulação de hTERT 380B
 retinoblastoma *veja* Gene Rb (retinoblastoma)
 terapia do câncer 735
 terapia gênica e 250-252
veja também genes/proteínas específicos
- Genes tecido-específicos 21
- Genes *Wnt*, mutagênese insercional por retrovírus 85B
- Genes/características dominantes 3F, 4, 5F
- Genes/proteína(s) ortóloga(s) 22, 23B
- Genes/proteínas *BRCA1/BRCA2*
 inativação do X e 509
 mecanismo de ação 509, 510F
 mutação/perda de função
 alterações cariotípicas 506, 507F, 508
 camundongo *knock-out* 505-506
 ligação com câncer de mama/ovário 505, 509, 522
 PARP1 e 520F, 520B
 penetrância 235, 509
 populações judias Ashkenazic 235
 reparo de DNA e 505-509, 524
 reparo de quebra dupla-fita e 505-509, 524
 resposta a dano no DNA 505, 506F
 senescência celular e 367F
 tipos de mutação 313F
- Genes/proteínas homólogas 23B
- Genes/proteínas *mdr*
 células-tronco 471
knock-outs, inflamação e câncer 446, 447F
 resistência a drogas 756
- Genes/proteínas *XPA* 499-500
 grupos de complementação 500, 500F
- Genética de populações 23B
- Genética mendeliana
 alteração/adaptação 3-4
 comportamento de genes/cromossomos 7-10
- evolução darwiniana 4-7
 regras básicas 2-4, 3F
- Genética
 aspectos histológicos 2-7
 células/organismos 1-24
 mendeliana *veja* Genética mendeliana
 populacional 23B
 regras básicas 2-4, 3F
 sistemas experimentais 3
- Genoma humano 2-3
 evolução 2B
 heterozigotidade em 2B
 retrovírus endógenos 92-93
 roedores 431
 sequenciamento 140, 146
 seqüências biologicamente importantes vs. "DNA-lixo" 6, 6F
- Genoma retroviral endógeno (ERG) 92-93
- Genoma(s) 2
 bibliotecas 23
 clonagem reprodutiva e 14F
 conteúdo gênico 7-8
 DNA-lixo 6, 6F, 7
 evolução 4-5
veja também Mutação(s)
 humano vs. roedor 431
 manutenção 226, 463-526, 517
 falha *veja* Instabilidade genômica
 histonas 523F, 523B
 papel de *BRCA1/BRCA2* 505, 509
 proteção física 464-466, 465F, 490, 517, 524
 terapia do câncer e 735
veja também Genes *caretaker*; Dano ao DNA;
 Reparo de DNA; Replicação de DNA
- mutabilidade 48
 redundância 4
veja também Cromossomo(s); Gene(s); genomas individuais
- Genoma(s) de roedores, vs. humano 431
- Genoma(s) viral(ais)
 bibliotecas 23
 evolução 77-78, 78F, 78B, 79B
 RNA vs. DNA 60B, 89
veja também vírus específicos
 vírus de tumor 66T, 67-68, 68F, 71, 73F
- Genomas diplóides 4, 9
- Genômica funcional 423
- Genótipo 3
 fenótipo e *veja* Correlações genóticas-fenóticas
- Glândulas mamárias
 adenomas, variações individuais no metabolismo e 493B
 câncer *veja* Câncer de mama
 cancerização de campo e progressão de tumor múltiplas etapas 16-17B, 16F
 células-tronco 470
 diferenciação 20-21F, 20B
 efeitos da gravidez 20-21F, 20B
 involução, apoptose 330
 telômeros (tecido normal) 389F
- Gleevec 757-765, 790
 ações 759, 762-764
 afinidade 759
 anticorpos monoclonais vs. 759, 760T
 classificação de tumor 41B
 curvas de resposta a dose 745F
 efeitos colaterais 760
 ensaios de cultura de células 747, 748F
 especificidade 759
 estágio inicial da terapia CML 759, 760-761, 760F
 estrutura química 738F
 inibição da proteína de fusão Bcr-Abl 747
 mecanismo de ação 738F
 resistência 761-762, 761F, 761T
 terapias alternativas 762, 764F
 triagem de mutantes 762, 763F
 taxa de recaída 761
 terapia antiangiogênese 580
 terapia para a doença mieloproliferativa 762
- terapia para a síndrome hipereosinofílica 762
 terapia para o meduloblastoma metastático 762
 terapia para tumores de estroma gastrointestinal (GISTs) 762-764, 764F
 testes clínicos 759-760
 tratamento do poxvírus 46B
veja também Proteína de fusão Bcr-Abl
- Glicogênio sintase cinase-3 β (GSK-3 β)
 estrutura 205F
 meia-vida 190
 supressão mediada por Wnt 145, 189, 190, 206, 239, 284
- Glicoproteínas, ECM 147
- Glicosaminoglicanos, estroma desmoplásico 546
- Glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) 40-41, 41F
- Glicosilases de DNA, reparo por excisão de bases 496
- Glioblastoma(s) 32
 alterações em EGF-R 111
 expressão do receptor EGF 757
 genes/proteínas do ciclo celular 297T
 mecanismo ALT para a manutenção dos telômeros 385
 síndrome de Li-Fraumeni 333F
- Glioma(s), metilação do promotor *MGMT* 494
- Glivec *veja* Gleevec
- Glutathione 492F
- Glutathione-S-transferases 491-492, 492F
- Gonadotropina coriônica humana (hCG), gravidez e risco de câncer de mama 20-21F, 20B
- gp100, antígeno associado a melanoma 688
- gp75, antígeno associado a melanoma 688
- Gráfico de Kaplan-Meier 100
- amplificação de *HER2/neu* em câncer de mama 101F
- amplificação de N-myc em neuroblastoma 107F
- expressão da telomerase em neuroblastoma 383F
- polimorfismo na p53 e terapia do câncer 42F, 42B
- Gravidez, risco de câncer de mama e 20-21F, 20B
- Grupo de genes 5
- Grupos de complementação, xeroderma pigmentoso (XP) 500, 500F
- GTP (trifosfato de guanossina), ligação a proteínas G 146-147, 146F
- GTPase(s) Rho pequenas 181-182
 ativação via PDGF-R 628
 domínio PH e ligação de PIP₃ 181, 205
 especificidade celular 629-630
 funções 182
 interações Ral-GEF 184
 metástase 627, 628F, 629-631, 631F
 RhoA 629
 RhoB 629
 RhoC 630-631, 631F
- GTPases semelhantes a Ras, metástase 624-631
- ## H
- Hamartin *veja* TSC1
- Haploinsuficiência 235, 236B, 247
- Hayflick, Leonard 359
- Hedgehog indiano 197, 780
- Hedgehog sônico (*SHH*) 197, 777, 780
veja também Sinalização Hedgehog
- Helicobacter hepaticus*, inflamação no cólon e câncer 442F, 442B
- Helicobacter pylori*, câncer gástrico e 115
 incidência/mortalidade 40B
 linfoma MALT 444
 papel da inflamação 454-455
- Hemangioblastoma, síndrome de Von Hippel-Lindau 241, 244F
- Hemangiomas, terapia com interferon 576-577
- Hematopoiese 469F
- Jaks (cinases Janus) 141, 143, 157
- leucemia e 468, 469F
- sinalização por Kit 140B
- Hemidesmosomos, matriz extracelular 532, 533F

- Hemiziosidade 2B, 220-221
 Hepatócitos 53, 296
 Hepatoma *veja* Carcinoma hepatocelular (HCC)
 Herceptina 704-708, 708-709B
 combinação na quimioterapia 705-706
 desenvolvimento 705
 estudos clínicos 705-706
 mecanismo de ação 40B, 706
 citotoxicidade celular dependente de anticorpos (ADCC) 706-707
 efeitos antiangiogênicos 707-708
 inibição de receptor 707, 708-709B, 709F
 internalização de HER2/Neu 40B, 707
 ligação de CD3 40B
 sinergia do mecanismo de assassinato 707, 707F
 modificação biespecífica 40B
 pós-operatório 706
 redução na liberação 548
 Herdabilidade, metilação do DNA 227, 228
 Herpesvírus humano-8 (HHV-8)
 etiologia do câncer 115
 receptores de transplante 678
 sarcoma de Kaposi 88B, 678
 sinalização pela proteína G 193
 Herpesvírus
 imunoevasão 34B
 indução de câncer 68
 sarcoma de Kaposi 88B
 sinalização pela proteína G 193
 HERV-K 93
 Heterocátron, fusão celular 210
 Heterodímeros 136, 147, 187F
 Heterozigoto(s), definição 4
 Hibridização de DNA 99F
 Hibridização genômica comparativa (CGH) 422-423, 422F, 423F, 519, 519F
 Hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) 9F
 amplificação de N-myc 107F
 bea-M (em FISH) 12F, 13F
 diversificação genética em tumores 421, 422F
 telômeros 369F, 388F, 389F
 hibridização *in situ* por fluorescência-m (m-FISH) 12F, 13F
 Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs) 480, 485, 486F, 487
 Hidrocarbonetos, carcinogênicos 48, 48F
 Hill, John 45
 Hipercalemia 643B
 Hiperinsulinemia, obesidade e câncer 10B
 Hiperoxia, senescência celular e 367
veja também Dano oxidativo (DNA)
 Hipertensão 36, 37F, 406
 hipometilação do gene/proteína, CTMP 229T
 Hipótese de segunda ordem de Knudson 213, 215-216, 216F, 247, 312, 415
 Hipótese “semente e solo”, metástase 32F, 32B, 636
 Hipoxia
 angiogênese 563
 macrófagos associados ao tumor (TAMs) 554F, 555
 modelo do camundongo transgênico Rip-Tag 564
 resposta, papel da proteína VHL 241, 244
 Histocompatibilidade 35B, 671
 Histologia/histopatologia 26-27, 26F, 27F
 classificação de linfomas de células B 730, 731F
 progressão e 403-408
 transição epitelial-mesênquimal *veja* Transição epitelial-mesênquimal (EMT)
 Histona H3, fosforilação 176
 Histona(s)
 controle transcricional e 227, 232, 280, 280F
 fosforilação 176, 263
 manutenção do DNA 523F, 523B
 senescência e 12-13F, 12B
 HMG-14, fosforilação 176
 Holoprosencefalia 777
 Homodímeros 136
 Homozigoto(s), definição 4
 Hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), secreção tumoral 375
 Hormônio da paratireoide, secreção por tumor 37B
 Hormônio(s)
 como promotores de tumor 440-441, 441F, 457
 gravidez e risco de câncer de mama 20-21F, 20B
 produção induzida por tumor 28
 secreção por tumores 37B
veja também hormônios específicos
 I
 IGF-1 *veja* Fator 1 de crescimento semelhante à insulina (IGF-1)
 Igreja de Jesus e dos Santos dos últimos dias (Mórmons), análise da árvore genealógica 237B
 Ilhas CpG 228
 Imatinib mesilato *veja* Gleevec
 Imortalização 301-302, 357-398
 células de camundongo 386, 431, 433
 células de câncer e tumorigênese 360, 361-364, 376, 458
 células em cultura 376
 células humanas
 camundongo vs. 386, 431, 433
 resistência à 431-434
 células-tronco humanas embrionárias 360
 linhagens celulares “normais” 425
 manutenção dos telômeros e 368-372, 393
 expressão da telomerase 376-380, 379F, 380F, 381-383, 396
 mecanismo ALT 383-386, 384F, 391, 397
veja também Telomerase; Telômero(s)
 Mdm2 e 320
 pressões seletivas 425-426
veja também Crise celular; Senescência celular
 Imunização passiva 723
 definição 704
 Herceptina *veja* Herceptina
 humanização de anticorpos 705, 705F
 imunotoxinas 712-713
 linfócito infiltrador de tumor 718-719, 719F
 linfócitos 713
 radioimunotoxinas 713
 terapia com enzima-pródroga 713
 tumores de células-B *veja* Terapia antidiotipo
 Imunoedição, definição 675
 Imunoevasão 458, 689-695, 690T, 692B, 723
 efeitos de célula T regulatória 703-704, 703F, 721, 723
 fuga imune 691
 interferência com o sistema imune 697-701, 720, 723
 depressão linfocitária 698
 secreção de FasL 697-698, 699F
 secreção do fator de crescimento transformante β 698
 secreção de interleucina-10 698
 oncoproteínas 693B
 proteínas de estresse e 696, 697
 proteínas reguladoras de complemento ligadas à membrana (mCRPs) 701, 702F, 703
 redução na expressão de antígenos 690-691
 resistência ao mecanismo de assassinato 701-703
 complemento 701, 702F, 703
 níveis das proteínas inibidoras de apoptose (IAPs) 701
 receptor Fas/FasL 697, 701
 supressão de MHC de classe I 34B, 691, 693F, 693B, 695
 depressão na síntese de β_2 -microglobulina 691-693, 694F
 modificação pós-traducional 691-692
 transportador associado à apresentação de antígeno 693, 694F
 tumores fracamente antigênicos 690, 720
 Imunogenicidade
 predição, imunologia tumoral 682
 proteína p53 36B
 proteína Src 125B
 Imunoglobulinas *veja* Anticorpos
 Imunologia tumoral 671-704
 anticorpos antitumor 679
 antígenos novos 681-683, 720
 ligação a MHC 682
 mutantes da p53 681
 mutantes da triosefosfato isomerase 682
 oncoproteínas Ras 681, 682
 translocações cromossômicas 681-682
veja também Antígenos de transplantação tumor-específicos (TSTAs)
 antígenos superexpressos 682-683
veja também Antígenos de transplantação associados a tumor (TATAs)
 citocinas 721
 citotoxicidade dependente do complemento 701
 evasão do sistema imune *veja* Imunoevasão
 experimentos de transferência passiva 672, 673F
 imunoevasão *veja* Imunoevasão
 indivíduos imunocomprometidos 677-679, 690
 predição da imunogenicidade 682
 reconhecimento imune 683-685
 tumores fortemente imunogênicos 675, 676F
 tumores fracamente imunogênicos 675, 676F, 723
 tumores quimicamente induzidos 672, 673F
 variação de antígenos 672, 720
 Imunoprecipitados, proteína Src 125F, 125B
 Imunossupressão
 malignidade associada à transplantação 30B
 rapamicina 783-784
 imunoterapia 704, 714-719, 721F, 721T, 723
 anticorpo anti-CTLA4 *veja* Anticorpo anti-CTLA4
 Bacillus Calmette-Gubrin (BCG) 715F, 715B
 células dendríticas *veja* Células dendríticas
 expressão autóloga de GM-CSF por células tumorais 717-718
 interferons 673, 718
 interleucina-2 718
 melhora na apresentação de antígeno 715-716, 716-717F
 Imunotoxinas 712-713
 Imunovigilância 669-672
 experimentos com camundongo nude 672
 experimentos com interferon- γ 673
 experimentos de transplante de tumor 670-671, 671F
 Inativação de X 115, 40
 estudos de monoclonalidade de tumor 40-41, 41F
 gene/proteína BRCA1 e 509
 Incidência de câncer 43, 44, 55-56
 ajustada à idade 402B
 câncer de próstata 41F, 41B
 compostos exógenos e 490
 efeitos da idade 395, 395B, 400-401, 400F
 efeitos polipictômicos 407, 407F
 Incidência de câncer ajustada à idade 402B
 Independência de ancoragem 147
 anoikis e 45
 controle do ponto de verificação 45
 fator de crescimento transformante β (TGF- β) e 45
 mediada por Ras 188
 tumor induzido por vírus 69, 70F
veja também Adesão celular
 Índice de massa corporal (BMI),
 Índice terapêutico 747-748, 751
 Indivíduos imunocomprometidos
 imunologia tumoral 677-679, 690, 720, 722
 tumorogenicidade mediada por vírus 70-71, 70B, 71F
veja também Infecção por HIV/AIDS; Imunossupressão; Transplantes de órgãos
 Indutores 144F
 “Ineficiência metastática” 596-597, 645, 649
 Infecção por HIV/AIDS
 homologia de HIV a hTERT 378F
 incidência de tumor 677, 677F
 infecções pelo vírus Epstein-Barr 678-679
 sarcoma de Kaposi 88B, 678
 Infecções pelo vírus Epstein-Barr (EBV) 115

- doença de Hodgkin 678
 infecção pelo HIV/AIDS 678-679
 linfoma de Burkitt e 18B, 68, 109, 110B
 receptores de transplante 678
 secreção de interleucina-10 699
- Inflamação**
 câncer colorretal e 442F, 442B, 450-451, 450F
 câncer gástrico 454-455
 ciclos BFB e câncer 393, 394F, 394B
 consequências mitogênicas 482B
 espécies reativas de oxigênio (ROS) 453, 482, 482B
 hepatite e câncer no fígado 442-444, 443F, 455
 interações heterotípicas, tumorigênese 532
 ligação com a patogênese do câncer 456T
 metástases e 33B
 modelo de camundongo transgênico Rip-Tag 565-566, 566F
 promoção tumoral 441-444, 442F, 442B, 443F, 444B, 454-457, 482B
 prevenção pelas NSAIDs 445, 448, 449F, 451F, 454, 456-457
 vias de sinalização 444-452, 451F
veja também vias/mediadores específicos
- Inibição da densidade 63**
 Inibição pelo contato 63
 Inibidor da cinase do fator nuclear- $\kappa\beta$ (IKK) 193, 439F, 445
 Inibidor de DNase ativada por caspase (ICAD) 342
 Inibidor do ativador de plasminogênio-1 (PAI-1), senescência celular 396B
 Inibidor do fator nuclear- $\kappa\beta$ (I κ B) 193, 445
 Inibidores da farnesiltransferase (FTIs) 43F, 43B
 Inibidores de apoptose (IAPs) 340, 341, 341F, 701
 Inibidores de cinase dependente de ciclina (CDKs) 268-273, 269F
 alterações no câncer 296T, 298-300
 estado pós-mitótico e 273, 273F, 293
 evolução 301
 interações com o complexo Ciclina-CDK 272F
 localização celular e 271, 271F
 mitógenos e 270-271, 270F
 ponto R e 272F, 273
 proteínas Cip/Kip 268
 proteínas INK4 268
 repressão mediada por Myc 287
 TGF- β e 268-269, 269F, 289
veja também proteínas específicas
- Inibidores teciduais das metaloproteinases (TIMPs)**
 genes supressores de metástase 643T, 644-645
 regulação das metaloproteinases de matriz 622-623
 supressão da angiogênese 572T, 574, 574B
- Iniciador de caspase(s) 342**
 Iniciadores de tumor 436, 439B, 467
 como promotores de tumor 453
veja também Carcinógenos; Mutágeno(s)
- Inositol trifosfato (IP₃) 177, 178F, 191, 191F**
Instabilidade cromossômica (CIN) 397F, 512-517, 512F
 câncer colorretal 512, 513F, 521
 ciclos BFB e 391, 393
 como ocorrência inicial no câncer 521
 defeitos moleculares causando 514-515, 516T
 inativação de Apc e 241
 perda de p53 e 515
 perda de RB e 514-515
 disqueratose congênita 388B
 persistência 514
 segregação errônea e 512-514
veja também Aneuploidia
- Instabilidade de microssatélite (MIN) 478**
 antígeno de transplante específico de tumor (TS-TAs) 687B
 câncer colorretal 292, 687B
 instabilidade cromossômica vs. 512, 513F
 detecção 479F
 mudança de fase de leitura 503, 687B
 reparo de pareamento errôneo e 478, 502-503, 502F, 687B
 taxa de mutação 501
- Instabilidade genômica 517-524**
 aneuploidia e 511
 controle do ponto de verificação e 260-261, 513
 evolução e 517
 hibridização comparativa de genomas 422-423, 422F, 423F, 519, 519F
 HNPCC 501
 imunologia tumoral 682
 perspectiva darwiniana 521
 progressão tumoral e 421-423, 422F, 458
 risco para uma célula cancerosa 520
veja também Dano ao DNA; Reparo de DNA; *tipos específicos*
- Interferon- β**
 imunoterapia 718
 terapia antiangiogênese 576-577, 578T
- Interferon- γ**
 amplificação do sistema imune 673
 imunoterapia 718
 imunovigilância 673
 indução da expressão de MHC de classe I 673
 liberação pelas metaloproteinases da matriz 539
 produção de células matadoras naturais 667-668, 673
 produção de células T auxiliares 665
- Interleucina-3 (IL-3) 178**
Instituto Nacional do Câncer, linhagens celulares de cânceres humanos 749
Integrina(s) 147-150, 158, 532
 adesões focais 148, 149F, 186
 ancoramento à ECM e citoesqueleto 148, 149F
 animais *knock-out* 150B
 estrutura 147, 148F, 187F
 subunidades 147, 150B
 funções 148, 186
 integrina $\alpha 5/\beta 1$ 147
 integrina $\alpha \beta_6$ 606, 608F
 ligantes 148T
 sinalização 186-188, 187F, 206
 cinase da adesão focal (FAK) 148, 186-187, 187F, 206
 de dentro para fora 148
 de fora para dentro 148
 fosfatidilinositol-3 cinase 178
ras e 149-150, 188
 transição epitelial-mesenquimal (EMT) 606, 608F
 tumorigênese e 150F, 150B
- Interações heterotípicas 527-586, 584F**
 células endoteliais 584F
 células linfáticas 584F
 definição 531
 fator de crescimento derivado de plaquetas 544
 fatores de crescimento mitogênicos 531, 531F
 fatores tróficos 531, 531F
 formação da fibrina 544, 545F
 inflamação 532
 localização de fatores de crescimento 535B
 macrófagos 584F
 mastócitos 584F
 matriz extracelular 584F
 membrana basal 584F
 neutrófilos 584F
 pericitos 584F
 recrutamento de fibroblastos 544, 584F
 sarcoma de Kaposi 582B
 sinais inibitórios de crescimento 531, 531F
 vazamento pelos capilares 545F
veja também Angiogênese; *fatores específicos*
- Interações proteína-proteína**
 como alvos proteicos potenciais para o desenvolvimento de drogas 738-739
 domínios SH *veja* Homologia com domínios Src (SH)
 estrutura modular das unidades 170F
- Intercruzamento, perda de heterozigotidade (LOH) e 218B**
Interferon- α
 imunoterapia 718
 terapia antiangiogênese 576-577, 578T
- Interleucina-10 (IL-10)**
 células T regulatórias (T_{regs}) 669
- imunoevasão e 698
 vírus de Epstein-Barr (EBV) e 699
- Interleucina-11 (IL-11), metástases 651F**
Interleucina-2 (IL-2) 718
Interleucina-4 (IL-4)
 produção por células T auxiliares (células T_H) 665
 sinalização por NF- κ B 775
- Interleucina-6 (IL-6) 775**
Interleucina-8 (IL-8)
 angiogênese e 560, 567T
 macrófagos associados a tumor (TAMs) 553
 produção pelo estroma do tumor 555
 supressão, interferon- α 576-577
- Intestino delgado**
 arquitetura, manutenção da 121, 121F
 câncer, tecido normal vs. 26F, 31F
- Intravasação, metástase 591-592**
Ítrons 18, 18F
Invasividade
 angiogênese e 568-569, 568F
 aquisição 458
 carcinoma(s) 39, 39F
 macrófagos 684
 reconhecimento imune vs. 683
- Íons superóxido 481, 482B**
IPA (12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato)
 ativação de PKC- α e 438, 439F, 445, 445F
 colaboração com a *ras* ativada 438, 438F
 como agente promotor 436-438, 436F, 437F, 438F, 467
 efeitos reversíveis 436
 estrutura 435F
 indução de papiloma 435-436, 436F
 IPA independence 435, 437
 inflamação e 441, 445F, 451F
 tratamento com DMBA (mutágeno) e 435, 436F
- Iressa 45B, 766-769**
 anticorpos anti-receptor de EGF vs. 766
 atividade 767-768
 especificidade 746F
 estrutura 766F
 farmacocinética 767, 767F
 genética 767-768
 ligação da tirosina cinase ao receptor de EGF 745, 768, 769F
 mecanismo de ação 766, 766F
 “vício de oncogene” 770-771B
 resistência 768-769
 terapia para câncer de pulmão de células não-pequenas 767-768, 769F
 testes clínicos 767
 testes pré-clínicos 768
 tumores PIEN-negativos 768
- IRK, estrutura 743F**
Irradiação ultravioleta B (UVB)
 cancerização de campo e 17F
 fotoprodutos de DNA 484, 485F
 sistemas de reparo 23B
veja também Reparo por excisão de nucleotídeos (NER)
 mutantes de RNA helicase 385
 p53 e câncer de pele 318B, 484
 xeroderma pigmentoso 235, 500
- Irradiação X**
 dano ao DNA 484
 células-tronco e 471
 experimentos de mutagênese 48
 indução da p53 317F
 indução de câncer 46, 56, 92
 linfócitos de pacientes com câncer de mama 24F, 24B
 mecanismo de mutagênese 52
- I κ B 774, 774F, 775-776, 775F**
- J**
Jagged ligante 143, 196
 Sinalização *veja* Receptor Notch
- Jaks (Janus cinases) 141, 143, 157**

via de sinalização Jak-STAT 185-186, 185F, 206, 759
 Janela terapêutica, Testes clínicos fase 1 752
 Junções aderentes 190, 541, 542F

K

KISS1, genes supressores de metástase 643T, 644
 K-ras
 adenocarcinomas de pulmão, modelos animais 736-737, 736T
 câncer colorretal e 409
 carcinomas pancreáticos, padrão de expressão 736
 oncogene viral 80, 99
 proto-oncogene, mutação e oncogenicidade 99, 106
 splicing alternativo 151

L

Lamelipódio
 metástase 625, 626F
 RalGEF e 184F
 Rho GTPase e 182
 Lâmina basal *veja* Membrana basal
 Laminina(s) 147-148
 clivagem pela caspase 342
 laminina 2 γ 607, 608F
 substrato para a metaloproteinase de matriz 622
 transição epitelial-mesenquimal (EMT) 607, 608F
 Leiomiomas, experimento de monoclonalidade 41
 Leiomiossarcoma 32F
 Leptina, angiogênese 567T
 Leucemia de células T 84, 87B
 Leucemia linfocítica aguda (ALL) 65, 33F
 Leucemia mielogênica aguda (AML) 33F
 análise por FACS 417, 417F
 desenvolvimento, terapia com ciclofosfamida 728
 diferenciação bloqueada em 4705
 eliminação de ARF 65
 inibidores da farnesiltransferase (FTIs) 435
 síndrome de Kostmann 440B
 síndrome mielodisplásica e 492
 Leucemia mielogênica crônica (CML) 33F
 crise explosiva 93F 293B
 cromossomo Filadélfia *veja* Cromossomo Filadélfia
 diferenciação e progressão 293F, 293B
 fase acelerada 293F, 293B
 fase crônica 293F, 293B
 fusão da proteína Bcr-Abl 757
 Gleevec 415, 759, 760-761, 760F
 inibidores da farnesiltransferase (FTIs) 43B
 mutação em células-tronco hematopoiéticas 468
 transplante de medula óssea (BMT) 713
 Leucemia promielocítica aguda (APL) 732-733, 733F
 Leucemia promielocítica, N-ras e myc ativadas 427
 Leucemia(s) 32, 33F
 diferenciação bloqueada 470B
 estudos com gêmeos 426F, 427, 427B
 genes/proteínas do ciclo celular 297T
 induzida por terapia gênica 87B
 mutação em célula-tronco hematopoiética 468
 síndrome de Li-Fraumeni 333F
 suscetibilidade de camundongos à 388
 terapia Gleevec 41B
 veja também tipos específicos
 Leucemias megacarioblásticas, diferenciação bloqueada em 470B
 Leucemogênese
 proteína de fusão Bcr-Abl 759
 terapia gênica 87B
 vírus da leucemia aviária 82-84, 83F
 vírus da leucemia de Friend, sinalização autócrina 134B
 Licenciamento, testes clínicos de fase III 754
 Ligação à proteína Arg, Gleevec 759

Ligação ao DNA, fatores de transcrição E2F 279F, 281
 Ligação ao patógeno, anticorpos 656, 657F
 Ligação de células infectadas, anticorpos 656-657
 Ligação de FKBP12 782F, 783F, 784
 Ligação genética 218, 237F, 237B
 Ligante de RANK (receptor ativador de NF- κ B) (RANKL) 638-639, 641F
 Ligantes Delta 143, 196
 sinalização *veja* Receptor Notch
 Ligase de DNA, reparo por excisão de bases 496
 Ligases ubiquitina, controle do ciclo celular 265
 Limpeza de chaminé, câncer de pele do escroto 45
 Linfangiogênese 559, 560F
 Células endoteliais 560B
 fator de crescimento endotelial vascular C (VEGF-C) 632
 metástase 632
 Linfócitos B *veja* células B
 Linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) 679, 650F
 câncer de pulmão de células não-pequenas (NSCLC) 680F
 células T regulatórias 703, 704
 imunização passiva 718-719, 719F
 melanoma 679
 Linfócitos intra-epiteliais (IETs), imunologia tumoral 685
 Linfócitos T citotóxicos (CTLs) 658, 663-665, 670F
 apresentação de antígeno por MHC de classe I 664-665
 ativação, células T auxiliares (células T_H) 664-665, 665F
 inibição, células T regulatórias (T_{reg}) 669
 ligação a TATA 690
 mecanismos de morte 658, 659F, 665, 666-667F
 apoptose mediada por receptor 344-345, 344F, 665, 666-667F, 697
 células infectadas por vírus 665
 perforina 665, 666-667F
 Linfócitos T *veja* Células T
 Linfócitos
 depressão em número, imunoevasão 698
 estroma tumoral 530
 expressão da telomerase 376
 imunização passiva 713
 interações heterotípicas, tumorigênese 584F
 migração, cura de ferimentos 539
 reparo de DNA em pacientes com câncer de mama 24F, 24B
 veja também tipos individuais
 Linfoma de Burkitt's
 ativação de *c-myc* por translocação recíproca 109-110, 109F
 incidência na África 109, 109F
 malária e 109, 110B
 vírus Epstein-Barr e 68, 109, 110B
 Linfoma de células B 729-731
 arranjos de expressão gênica 730, 731F
 histologia 730, 731F
 Linfoma folicular, Rituxan 711
 Linfoma grande difuso de célula B (DLBCL)
 antagonistas de NF- κ B 777
 CHOP 711
 Rituxan 711
 Linfoma MALT, *Helicobacter pylori* e 444
 Linfoma não-Hodgkin 680T, 710-711
 Linfoma primário de célula B mediastinal (PMBLs) 730-731, 731F
 Linfoma(s) 32
 camundongo E2F *knock-out* 6B
 genes/proteínas do ciclo celular 297T
 suscetibilidade de camundongos a 388
 veja também tipos específicos
 Linfomas semelhantes a células B ativados (ABCs) 730-731, 731 F
 Linfomas semelhantes ao centro germinal de células B 730
 Linfonodo-sentinela, metástase 633, 633F, 634B
 Linfonodo(s) 662F
 "drenagem" 632, 633F

como "ruas sem saída" 632
 metástase para *veja* Metástases nos linfonodos
 Linhagem celular C3H1OT1/2, experimentos de transfecção 96, 97, 115
 Linhagem celular NIH 3T3
 como células "normais" 425
 experimentos de transfecção de DNA 96, 97, 115, 424-425
 Linhagem celular
 C. elegans 358F
 capacidade replicativa 359-360, 359F
 "relógio generacional" 364, 368
 número limitado 363-364
 veja também Senescência celular; Imortalização de telômeros em camundongos normais vs. camundongos mTR^{-/-} 389F
 Linhagem germinativa
 células-tronco como tecido "da linhagem germinativa" 47B
 haploidia 9
 mutações 11, 14
 gene/proteína *VHL* 241
 genes de reparo de pareamento errôneo 501
 genes supressores de tumor 226B, 332-333
 GISTs e 426-427
 oncogenes 142B, 226B, 427
 populações étnicas e 23B
 receptor de tirosina cinases 140, 142B
 síndromes familiares de câncer 140, 142B, 332-333, 501
 vírus endógeno (s) 92-93, 94B
 Linhagens celulares 360
 células de câncer *veja* Linhagens celulares imortais 360, 425
 como células "normais" 425
 veja também Imortalização; tipos celulares específicos
 Linhagens celulares cancerosas
 cânceres "normais" vs. 537, 538B, 539F
 células independentes de estroma 25F 255
 desenvolvimento 536-537
 diferenças xenoinxerto 537
 dificuldades na adaptação do crescimento *in vitro* 536
 limitações para o desenvolvimento de drogas 538B, 539F
 Linhagens humanas de câncer 749
 Lipídeos inositol
 estrutura 176-177, 178F
 veja também tipos específicos
 vias intracelulares de sinalização 176-183, 205
 desregulação no câncer 182-183, 183T
 sinalização por GPCR e 191, 191F
 Lipossarcoma 32F
 Loco genético 8, 9F
 veja também Gene(s)
 Lúpus eritematoso sistêmico (SLE), destruição de glomérulos 668F

M

Macrófago(s) 670F, 722
 apoptose, fator de crescimento transformante 698
 associado a tumor *veja* Macrófagos associados a tumor (TAMs)
 ativação 684F
 como células apresentadoras de antígeno 684
 fagocitose 658, 658F
 imunologia tumoral 684-685
 interações heterotípicas, tumorigênese 584F
 invasividade tumoral 684
 metaloproteinase 9 de matriz (MMP-9) 622
 migração, cura de ferimentos 539
 papéis 684F
 produção do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) 559, 684
 produtos oxidativos 482B
 propriedade tumoricida 556
 remodelamento dos tecidos 684

- Macrófagos associados a tumor (TAMs) 530, 551-556, 555F, 584, 684
 áreas hipóxicas 554F, 555
 câncer de bexiga 555
 câncer de mama *veja* de câncer de mama
 câncer de ovário 555
 câncer de pulmão de células não-pequenas 554F
 desenvolvimento a partir de monócitos 544F, 551, 553F
 estimulação da angiogênese 552-553, 554F, 555-556
 metaloproteinase-9 de matriz 554F, 555-556, 622
 produção de VEGF 553, 554F
 recrutamento 553F
 secreção de interleucina-5 553
 transição epitelial-mesenquimal 612-613, 612F
 Macronúcleo, dilatado 14F, 14B
 MAGE-1, antígenos de transplantação associados a tumor (TATAs) 688F, 689
 MAGE-3, antígenos de transplantação associados a tumor (TATAs) 689
 Malária, linfoma de Burkitt e 109, 110B
 Malignidade associada à transplantação 30B, 677-678, 677F, 680T
 Malignidades hematopoiéticas 32, 33F, 33T, 55
 cariótipo 513B
 diferenciação bloqueada em 470B
 translocações cromossômicas 511
 transplante de medula óssea 713
veja também Leucemia; Linfoma(s); *malignidades específicas*
 Malignidades pediátricas
 neuroblastoma, *veja* Neuroblastoma(s)
 taxas 4
veja também cânceres específicos
 MAP cinase cinase (MAPKK) 174-175, 175F
 MAP cinase cinase-cinase (MAPKKK) 175, 175F
 Marcação com biotina, ensaio TUNEL 7F, 75
 Marcação de DNA, análise da mutagenicidade 525
 Marcadores anônimos de sequência 2B
 Marcadores de substitutos 750-751
 Marcadores moleculares *veja* Biomarcadores
 Marimastat, terapia antiangiogênica 578T
 MART-1, melanoma 692B
 Mastócitos
 carcinomas de células escamosas 530F
 cura de ferimentos 539
 estroma tumoral 530, 530F, 583
 interações heterotípicas, tumorigênese 584F
 migração 539, 583
 troca antigênica 565B
 Matrilisina (metaloproteinase 7 de matriz; MMP-7) 564T
 Matriz extracelular (ECM) 28, 147F, 404
 componentes/construção 15, 145B, 147, 532, 533F
 degradação, metaloproteínas de matriz 538-539
 hemidesmossomos 532, 533F
 interações heterotípicas na tumorigênese 584F
 ligação de fatores de crescimento e liberação da 145B
 membrana basal 533F
 metástases no osso 639, 639F
 ponto de verificação do ciclo celular dependente de ancoragem 4B
 receptores de superfície celular 147, 154, 158, 186
 fatores de crescimento *veja* Receptor(es) de fator de crescimento
 integrinas *veja* Integrina(s)
 papel 149
 remodelação, transição epitelial-mesenquimal 622
 TGF- β e independência de ancoragem 4B
veja também Adesão celular
 McClintock, Barbara 369F, 393
 Mecanismo ALT para a manutenção telomérica 383-386, 384F, 397
 ciclo BFB induzido 391
 escolha de cópia 375F, 384
 Mecanismo mobilizador de cálcio, câncer de mama e metástases ósseas 640, 641F
 mecanismos antiapoptóticos
 Akt/PKB e 180, 181T, 337
 Bcl-2 e proteínas relacionadas 334-335, 335F, 336, 337, 338F, 339F, 345
 balanço com duas proteínas pró-apoptóticas 338-339, 339F, 352-353
 Bcl-x_L 335F, 337, 338F
 Myc e 335F
 células cancerosas 346-350, 348T, 349F, 352
 desregulação de Bcl2 347
 expressão de NF- κ B 348
 inativação da p53 *veja* proteína p53
 inativação da PTEN 348
 inativação de Apaf1 347
 mutação/perda de ARF 324, 332, 347
 superexpressão de Mdm2 320, 332
 via da PI3K/Akt/PKB 347-348
 fatores de crescimento 163
 fatores tróficos 345-346
 integrinas e 186, 188, 188F
 NF- κ B 19B
 receptor EGF 766
veja também Sobrevida celular
 vírus tumorais de DNA 95
 Mecanismos etiológicos, variação geográfica e 45
 Medula óssea
 disqueratose congênita 388F, 388B
 metástases 589F
 transplantação (BMT) 713-714
 Meduloblastoma(s) 32, 35F
 citometria de fluxo 418F
 metastático, terapia 762
 modelos animais 782
 via de sinalização Patched-Smoothed 778-779F, 782
 MEK *veja* MAP cinase-cinase (MAPKK)
 Melanina, função protetora 490-491, 491F
 Melan-NMART, antígeno associado a melanoma 688
 Melanócitos 34, 36F, 490-491, 491F
 Melanoma(s) 34, 36F
 antígenos/antigenicidade 38B, 683, 687-688, 688F, 691, 692B
 doação 39F, 39B
 genes/proteínas do ciclo celular 297T, 298
 imunoevasão 693, 693B, 699F
 incidência 789F
 linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) 379
 metástases 588
 invasão 592F
 micrometástases 645
 modelos animais, H-ras 736-737, 736T
 mortalidade 789F
 mutantes *13RAF* 184
 mutantes da triosefosfato isomerase 682
 ocular, p53 e 318B
 receptores de transplantes de órgãos 679, 680T
 resposta imune a 682, 688, 689F
 sinalização por Ras/Raf 176
 suporte sanguíneo 557F
 tecidos (cultura de) 38B
 terapia com anticorpos anti-CTLA4 717
 Melanossomas 491F
 Membrana basal 28-29, 28F, 404
 angiogênese 567-568, 568F
 interações heterotípicas, tumorigênese 584F
 matriz extracelular 533F
 modelo de camundongo transgênico Rip-Tag 567-568, 657F
 quebra 406, 591-592
veja também Metástases
 Membrana celular *veja* Membrana plasmática
 Membrana plasmática 178F
 fosfolípidos 176-177, 178F
 receptores *veja* Receptores de superfície celular
 sinalização através 119-120, 120F
veja também Transdução de sinal; *vias específicas*
 Mendel, Gregor 2-4, 2F, 3F
 Menina, regulação por hTERT 380B
 Mesoderme 30, 30F
 Mesotelioma 67B, 403, 403F
 Metabolismo de drogas, resistência e 756
 Metabolismo intermediário, enzimas 15
 Metabolismo
 carcinógenos/mutágenos 50, 53, 485-490, 524
 flora gastrointestinal 22B
 glutatona-Transferase 491
 variação individual 493B
 metabolismo intermediário 15
 taxa e dano oxidativo ao DNA 482, 484F
 metaloproteinase(s) de matriz (MMPs)
 adenocarcinomas colorretal 554F
 cura de ferimentos *veja* Cura de ferimentos
 indução do fator de crescimento induzível por hipóxia 583
 podossomos 623, 623F
 regulação 622-623
 secreção pelo estroma desmoplásico 546
 substratos 622
 transição epitelial-mesenquimal 606F, 621-623, 621F, 650
veja também tipos individuais
 Metaloproteinase-1 de matriz (MMP1) 564T
 Metaloproteinase-11 de matriz (MMP-11) 564T
 Metaloproteinase-2 de matriz (MMP-2) 564T, 622
 Metaloproteinase-3 de matriz (MMP-3) 564T, 623, 623F
 Metaloproteinase-7 de matriz (MMP7) 564T
 Metaloproteinase-9 de matriz (MMP-9) 564T, 555-556, 564T, 565, 566F, 622
 Metaplasia 36-37, 37F
 Metástase 406, 587-654, 588F
 “câncer de origem desconhecida” (CUP) 648-649
 “cascata de invasão da metástase” 590, 591F, 652
 angiogênese 591, 632
 aquisição da 458
 brecha na membrana basal 591-592
 colonização 594-597, 634-637, 652, 653
 acesso aos tecidos 635-636
 adaptações ambientais 634-635, 635B
 detecção 596, 596F
 eficiência 634
 microambiente 634, 652, 653
 micrometástases 595
 modelo “semente e solo” 32F, 32B, 636
 padrões de fluxo sanguíneo 636, 637, 637F, 653
 quimioquímica tecido-específica 637
 teoria do “código postal vascular” 637
 tropismo tecidual 635F
 espalhamento hematológico 631-632
 extravasação 594, 594F, 595F, 595B, 624, 653
 fatores epigenéticos 649-650
 fatores genéticos 649-650, 651F, 651B
 genes supressores 642-645, 643T
 definição 643
veja também genes específicos
 GTPases semelhantes à Ras 624-631
 ineficiência metastáticas 596-597, 645, 649
 intravascular 591-592
 invasão 593B, 652
 microtrombos e 28-29F, 28-29B, 653
 migração 592-593
anoikis 592
 atalhos arteriovenosos 594
 capilares *bypass* 594
 capilares, abrigo nos 593, 594F
 forças de divisão 593
 formação de microtrombos 593
 pulmões, confinada nos 593-594, 594F
 receptores de superfície celular 594
 rotas através do corpo 593F
 motilidade celular 624-631, 652
 adesões focais 629
 Cdc 627, 627F, 628F, 629
 citoesqueleto 625, 625F, 627
 contração do corpo celular 629
 criação da fibra de estresse 625F, 628F, 629
 fator de crescimento de hepatócito 613F, 614F, 625

- filopodia 625, 627, 627F
 lamelipódios 625, 626F
 mediada por EGF 630-631, 630F
 Tiamí 629
veja também Migração
 vias de sinalização 627, 628F, 629
- números de genes 649
 padrões de expressão gênica 646-647, 647F, 648F
 processo 649B
 programas de desenvolvimento preexistentes 649
 seleção darwiniana e 34B
 transição epitelial-mesênquimal *veja* transição epitelial-mesênquimal
 tumor primário, indicações em 588-589, 646
 similaridade genética 648F
- Metástases 27, 27F, 55
 astrocitomas 588
 câncer colorretal *veja* Câncer colorretal
 câncer de mama *veja* Câncer de mama
 câncer de próstata 588
 câncer pancreático 589F
 carcinomas de células escamosas 588
 células do estroma 533, 535, 536F
 células humanas transformadas 434
 células-tronco tumorais 33B
 efeitos do tamanho original do tumor 572-573
 extrações dentais e 33B
 gene *MMPI* (metaloproteinase-1 de matriz) e 651F
 gene *OPN* (osteopontina) 651F
gene-11 (interleucina-11) 651F
 imunoevasão, microtrombos 697
 inflamação e 33B
 linfonodos *veja* Metástases nos linfonodos
 medula óssea 589F
 melanomas 588, 592F, 645
 mortalidade 588, 652
 para o osso *veja* Metástases do osso
 processo da *veja* Metástase
 supressão pela angiostatina de 573-574
 supressão por endostatina de 573-574
veja também Micrometástases
- Metástases de osso osteoblástico *veja* Metástases de osso
 Metástases de osso 638-642, 641F
 câncer de mama e 638, 639-640, 641F
 câncer de próstata e 635
 fator de crescimento de fibroblasto (FGF) 640
 fator de crescimento transformante- β (TGF- β) 640
 fator 1 de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) 640
 matriz extracelular 639, 639F
 osteoblásticas 638, 640F, 641-642
 associação com câncer de próstata 638
 endotelina-1 641
 osteolíticas (ativação dos osteoclastos) 638, 640F, 643B
 associação com câncer de mama 638
 fator de crescimento transformante β 642F, 6425
 hipercalcemia 643B
 peptídeo relacionado ao hormônio da paratireóide 642B
 osteotropismo 638
 proteínas morfogenéticas do osso (BMPs) 640
 receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF-R) 640
 tratamento com bisfosfonato 640-641
- Metástases nos linfonodos 631-633, 652
 câncer de mama 632, 633F
 câncer de tireóide 634
 como marcadores substitutos 633
 como plataformas 632
 linfangiogênese 632
 sentinela 633, 633F, 634B
- Metástases de osso osteolíticas *veja* Metástases de osso
 Metazoa (animais multicelulares) 2
 conservação evolutiva 22, 30
 defesas anticâncer, evolução 399-400
 organização celular 25
- Metilação CpG 227, 228
 desregulação da função da p53 480
- desregulação da função de RB 298
 eventos de desaminação 480
 herdabilidade 227, 228
 risco de mutação 25
- Metilação do DNA
 análise da sequência e 423
 de células cancerosas 298
 genes de reparo de pareamento errôneo 503-504, 504F
 hipermetilação 231, 231F
 hipometilação 228, 229, 229T, 230, 230F, 231F, 412
 de novo 228
 eventos de desaminação e 480
 ilhas CpG *veja* Metilação CpG
 inativação da supressão tumoral 226-232, 248, 298
 manutenção após a replicação 227, 227F
 medida *in situ* 230F
 perda de heterozigotidade e 230
 promotores *veja* Elementos promotores
 remoção 227, 494-495
- Metilação, DNA *veja* Metilação do DNA
 Metilases de DNA 227, 227F, 228
 Metilases de manutenção 227, 227F
 Metilases *de novo* de DNA 228
 5-metilcitosina, desaminação espontânea 480, 481F, 496
 3-metilcolantreno (3-MC)
 como agente iniciador 38B, 439, 439B
 experimentos de transfecção de DNA 96
 na fumaça do cigarro 439
- Metilnitrosouréia (MNU) 439B
- Microambiente
 metástase 634, 652, 653
 transição epitelial-mesênquimal 605, 606F
- Micrometástases 588-589, 650, 652
 atalhos peritoneovenosos e 32B
 colonização 595
 dormência/persistência 597, 600F, 645-646, 646B, 650
 heterogeneidade genética 598-599F, 598B
 prognóstico clínico 645-646, 645F
- Micronúcleos, análise da mutagenicidade 52B
 Micronúcleos, ciliados 14F, 14B
 Microtrombos, metástase e 28-29F, 28-29B, 593, 653, 697
- Microvasos
 desenvolvimento 532, 534-535F
 terapia anticâncer e 26B, 27F
- Mieloma 41, 42F
veja também Mieloma múltiplo (MM)
- Mieloma múltiplo (MM) 33F
 fator de crescimento endotelial vascular 775
 terapia velcade 773
 vias de sinalização 774, 774F, 775F
- Migração celular 15
 metástase *veja* Metástase
 Sinalização de ErbB 120F
- Migração *veja* Motilidade/movimento celular
 Mioblastos, diferenciação 292-293, 294, 294F, 295F
- Miócito(s) 31
 diferenciação em 292-293, 294, 294F, 295F
 músculo liso *veja* Células de músculo liso
- Miofibroblastos
 actina- α de músculo liso 546F
 angiogênese 551, 558
 câncer de próstata 546F
 carcinoma hepatocelular 546F
 cura de ferimentos 545, 546F
 estroma de tumor *veja* Estroma tumoral
 indução, fator de crescimento transformante β (TGF- β) 545
 produção de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) 559
 recrutamento de precursores de células endoteliais 551, 552F, 558
 secreção 551
- Miogenina 294
- Mitocôndria 337F
- ação direta de p53 em 350B
 apoptose 334-342
 fragmentação 338
 liberação do citocromo c 336, 337F
 membrana externa 336
 polimorfismo de DNA, sarcoma de Kaposi 88B
 produção de espécies reativas de oxigênio 481-482
- Mitógeno(s) 122
 ciclo celular e 255, 270-271, 270F
 fosforilação de RB 282-284
 ponto de transição R 277F
veja também Relógio do ciclo celular
 como promotores de tumor 440-441, 441F
 interações heterotípicas, tumorigênese 531, 531F
 necessidade diminuída de células de câncer em 458
veja também Fatores de crescimento; *moléculas específicas*
 vias de sinalização 126, 161, 766
veja também Receptor(es) de fator de crescimento
- Mitose 256, 258-259, 258F
 alterações nos níveis de ciclinas 265, 265F
 complexidade 516
 controle de pontos de verificação 260, 516-517
 células de câncer e 260-261
 fases 258, 258F
 mutantes da BRCA2 506, 507F
 números em camundongo vs. humanos 433
 recombinação homóloga, LOH e 217-218, 217F
 segregação/segregação errônea 512-514, 514F
- Mixoma(s), vírus tumoral 59-60
MKK4, genes supressores de metástase 643T
- MMP de membrana (MT1MMP) 622
- Mnk1 cinase 176
- MNNG (N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina) 439B
- Modelo de camundongo Rip-Tag 564-566, 564F
 apoptose dependente de p53 564
 fator de crescimento endotelial vascular 565
 hipóxia 564
 histologia 563-564
 inflamação 565-566, 566F
 integridade da membrana basal 567-568, 567F
 metaloproteinase-9 de matriz 565, 566F
 terapia antiangiogênese 576, 577-578, 578F
 troca angiogênica 565, 566F
- Modelos animais
 camundongo vs. galinha 355
 carcinogênese química 47-48, 47F
knock-in *veja* animais *Knock-in*
knock-out *veja* animais *Knock-out*
 roedores 429-430
 testes de tumorigenicidade 70-71, 71F
 transgênico *veja* Animais transgênicos
veja também modelos específicos
- Modelos humanos de enxerto de tumor 749-750, 749F, 792
- Modificação pós-traducional 17, 19B
 cinases dependentes de ciclina (CDKs) 273, 274B
 imunoevasão e 691-692
 proteína p53 *veja* Proteína p53
 proteína Ras 43F, 43B
veja também modificações específicas
- Moléculas de sinalização 15-16, 120, 160, 198
 acesso a parceiros de sinalização 160
 como aparato no processamento de sinal 202
 especificidade 160
 estruturas 204, 205F
 interconexões 202, 202F
 mecanismos de ação 200-201, 202
 terapia do câncer 735
 transdução *veja* Transdução de sinal
veja também *moléculas/vias específicas*
 vias *veja* Vias de sinalização
- Monócito(s)
 câncer colorretal 530F
 desenvolvimento de macrófago associado a tumor 544F, 551, 553F
 estroma tumoral 530F, 551-552, 554F, 583

migração 551-552, 554F, 583
cura de ferimentos 539, 544F

Monoclonalidade 39-43
células transformadas 63
fatores que causam confusão 42-43
perspectiva darwiniana 413-416, 414F
policlonalidade vs. (provas) 40-41, 40F, 41F, 42F
subpopulações clonais 42-43

Montagens multiprotéicas 16F

Morfogênese, *anoikis* e 188F

Morfógenos 85B

Mórmons, análise da árvore genealógica 237B

Mortalidade cardiovascular, mortalidade do câncer vs. 47F, 47B

Morte celular
apoptose *veja* Apoptose
autofagia 353, 353F
necrose 335, 336T

Motilidade/movimento celular 15
GTPases Rho e 182
indução por fatores de crescimento 163
integrinas e 186
metástase *veja* Metástase

Mucosa intestinal
microanatomia 404F
progressão tumoral 403-407, 405F
reposição de células 404
tecido normal vs. neoplásico 26F, 31F, 405F
veja também Câncer

Mudança de classe 225, 509B

Mudanças estereotípicas, receptores tirosina cinases (RIKs) 139-140

Mulheres nuplparas, risco de câncer de mama 20-24F, 20B

Mulheres que já pariram, risco de câncer de mama e 20-21F, 20B

Mutação neutra (silenciosa) 6-7, 6F
veja também Polimorfismo

Mutação(ões) 4, 25, 454
agentes alquilantes 49, 439B, 484-485, 485F
ativação de proto-oncogene 105, 105F, 106, 106T
efeitos aberrantes do crescimento celular 93
evolução do genoma 4-5
induzida por BFB 391
linhagem germinativa 11, 14
neutra (silenciosa) 6-7, 6F
veja também Polimorfismo
número necessário para transformação 424-427
p53 e 328-329
papel na tumorigênese 399
prevenção de 463-526, 517
organização tecidual 464-466, 465F, 490, 524
veja também Reparo de DNA
produção de carcinógeno 51
selecionada 6F
somática 14-15
substituições 439B, 484
taxa 424
mutações pontuais 425
progressão tumoral e 415, 420, 421-423, 421F
transição 480
transversão 22B, 482
veja também Dano ao DNA;

Mutação(ões) selecionadas 6F

Mutações de sentido trocado, ativação de proto-oncogenes 152-153

Mutações de transição 480

Mutações deletórias, gene *Rb* 219, 221

Mutações pontuais
ativação de proto-oncogene 105, 105F, 106, 106T
circuito de sinalização da Ras 106, 106T, 114, 116, 152-153, 153F, 158, 198, 424
dimerização de receptor independente de ligante 138-139
como único evento na transformação 424-427
desaminação 5-metilcitosina 480
gene/proteína *p53* 310, 313F, 326, 333, 350, 487F
mudança de classe de imunoglobulina e 22B

polimorfismo *veja* Polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs)

taxa 425

transições 480

transversões 22B, 482

Mutações que trocam a fase de leitura
gene *H-ras* 105-106, 105F
instabilidade de microssatélites e 503, 687B
pS3 332

Mutações *SMO*, carcinomas de células basais (BCCs) 780

Mutações somáticas 14-15
controle das 517
genes de reparo de pareamento errôneo 503
genes supressores de tumor (TSGs) 213, 215, 216F
hipermutação, sítios de ligação ao antígeno 225
prevenção/reparo 226

Mutagênese insercional 82-84, 83F, 85B, 85T, 86, 89, 108

Mutagênese/mutagenicidade 48
carcinogênese e 48-52
DMBA (7,1 2-dimetilbenz[a]antraceno) 437
insecional 82-84, 83F, 85B, 85T, 86, 89, 108
proliferação celular e 453
testes 52B
confiabilidade de testes em roedores 455F, 455B
problema do promotor de tumor 453, 454
teste de Ames 49-51, 50F, 56
veja também Mutágeno(s)

Mutágeno(s)
ativação de proto-oncogene 97-98
ativação endógena de retrovírus 93
carcinógenos 48-52, 93, 435
iniciação tumoral e 439B
na fumaça do cigarro 439
potencial mutagênico vs. carcinogênico 51F
exógena 483-490
feitos pelo homem, câncer e 494B
indução de câncer 52-53
tumorigênese múltiplas etapas e 424
metabolismo de 485-490, 524
processos endógenos e 479-482
veja também Mutagênese/mutagenicidade; *mutágenos específicos*

Mutantes BRAF184, 198

Mutantes da triosefosfato isomerase 682

Mutantes dominante-negativo
gene/proteína *p53* 312, 314F, 350
hTERT gene/proteína 381-382, 382F

Mutantes sensíveis à temperatura (ts), vírus do sarcoma de Rous (RSV) 64-65, 65F, 88

N

N-acetil transferase (NAT) 493B

Não-disjunção cromossômica 220B, 513

Não-disjunção *veja* Não-disjunção cromossômica

N-caderina *veja* Caderina

N-caderina, transição epitelial-mesenquimal (EMT) 602, 603F, 604

Necrose
apoptose vs. 335, 336T
estroma de tumor 556, 557F, 558F

Neoplasia 39
veja também Câncer; Tumor(es)

Neoplasia endócrina múltipla 142B

Neoplasia intra-epitelial prostática (PIN) 389F, 568F

Neovastat, terapia antiangiogênese 578T

Neuroblastoma(s) 32, 35F
expressão da telomerase 383F, 383B
expressão de N-myc 107, 107F, 107B, 349, 383B
supressão de MHC de classe I 693, 693B

Neurofibroma(s) 233, 233F, 234

Neurofibromatose
tipo 2 225T, 233
tipo I (doença de von Recklinghausen) 233, 233F
defeito no gene *veja* Gene/proteína *NFI*

Neurofibromina 234-235, 235F

Neurofibrossarcoma(s) 233, 233F

Neuropeptídeos, câncer de pulmão de células não-pequenas 192

Neutralização de partículas, anticorpos 661

Neutrófilos
interações heterotípicas, tumorigênese 584F
metaloproteinase-9 de matriz (MMP-9) 622
migração, cura de ferimentos 539, 544F
produtos oxidativos 482B
síndrome de Kostmann 440F, 440B

Neutropenia, síndrome de Kostmann 440B

Nevi displásico, marcador de senescência 367F

NF- κ B *veja* Fator nuclear- κ B (NF- κ B)

NKG2D, células matadoras naturais (NKC)s 695-696, 696F

N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG) 439B

Nódulos de Lisch, neurofibromatose tipo 1 233, 233F

Normoxia, papel da proteína VHL 241, 244

Northern blotting, método 99F

N-ras
co-ativação/colaboração com myc 427
mutação e oncogenicidade 106, 106T

Nucleossomos 12-13F

NVP-AEWS41 45B

O

O⁵-metilguanina DNA metiltransferase (MGMT)
veja Gene/proteína *MGMT*

Obesidade, ligação com câncer 10F, 10B

Oligodendroglioma 35F

Omnitarg (pertuzumab), mecanismo de ação 709F, 709B

Oncogene *El*, experimentos de co-transfecção 427-428, 428F

Oncogene Fes 80

Oncogene HBX 443

Oncogene *rel* 193, 195

Oncogene *tax* 84, 90

Oncogene viral (v-src) 75-77, 76F, 86, 123
evolução 77-78, 78F, 78B
mecanismo de ação 172B

Oncogene(s) 86, 89, 115
celular 91-115
ativação *veja* Proto-oncogene(s)
clonagem 104F, 104B
detecção por transfecção viral 93-98, 96F, 98F, 115
eventos mutacionais únicos e 424-427, 429
relação com genes virais 98-104, 99F, 100T, 115
co-ativação/colaboração 335F, 427-429, 428F, 428T, 429T, 430, 459, 460F
experimentos com animais transgênicos 430, 431F
experimentos de co-transfecção 427-428, 428F
vírus de DNA 18B
controle transcricional 103
experimentos de parada, resistência a drogas 755
fenocópias de promotor de tumor 451-452
identificação 75, 76B, 99, 99F, 221
mutações em linhagens germinativas 142B, 226B
notação/terminologia 108
precursores celulares normais *veja* Proto-oncogene(s)
proteínas codificadas *veja* Oncoproteína(s)
transformação e
colaboração *veja* Co-ativação/colaboração
mutações únicas 424-427
veja também Transformação
veja também genes individuais
viral 77, 81T, 116
aquisição 77-78, 78F, 78B, 80, 81T, 103
dominância 210, 212-213, 252
ocorrendo naturalmente 84

Oncogenes celulares *veja* Oncogene(s)

Oncoproteína E6, aneuploidia e 515

Oncoproteína E7 18B
duplicação dos centrôssomos 514-515
interação com RB 275, 284

- Oncoproteína ES, ações 18B
 Oncoproteína Ski, mecanismo de ação 291-292
 Oncoproteína Sno, mecanismo de ação 292
 Oncoproteína(s) 86
 alterações estruturais 111-112
 proteínas híbridas 112
 proteínas Ras 105-106
 receptores de fator de crescimento 111, 111F, 138-139
 como alvo para a terapia do câncer 735-737, 736T
 imunoevasão 693B
 mecanismos de ação 103, 111-112, 112F, 119, 123
 cascata comum de sinalização 155
 como fatores de transcrição 289B, 289T
 fatores de crescimento e 132-135
 interações com a p53 307-308, 308F, 309F, 309T
 interações com a proteína RB/bolso 274-275, 275F, 276B, 279F, 284, 297, 309T
 receptores de fator de crescimento e 129-132
 sinalização intracelular 119-158, 156
 veja também Fator de crescimento(s); Receptor(es) de fator de crescimento; moléculas específicas
 regulação de hTERT 380B
 terapia do câncer 735
 veja também proteínas específicas
 Opsonização 657-658, 658F
 Organismos 1-24
 multicelular *veja* Metazóário (animais multicelulares)
 OSI-774 *veja* Tarceva
 Osso (s)
 câncer
 metastático *veja* metástases no osso
 terapia 641
 veja também tipos específicos
 osteoblastos 31, 638, 639
 osteoclastos 638, 639F, 641 F
 reciclagem 638, 639F
 Osteoblastos 31
 produção de osteoprotegerina 639, 642F
 reciclagem de osso 638
 Osteoclastos
 RANK (receptor ativador de NF- κ B) produção de ligante (RANKL) 638, 641F
 reciclagem de osso 638, 639F
 Osteoprotegerina (OPG) 462F, 639, 641
 Osteossarcoma 32F
 genes/proteínas do ciclo celular 397T
 mecanismo ALT de manutenção de telômeros 385
 retinoblastoma familiar (bilateral) e 214, 221
 Osteotropismo, metástases de osso 638
 Ovários, remoção e risco de câncer de mama 440
 Ovelha Dolly 14F
 Oxidação lipídica 481, 496
 Óxido nítrico, liberação por células fagocíticas 482B
 8-oxo-deoxiguanosina (8-oxo-dG) 482, 483F, 483B
 8-oxoguanina 482
- P**
- P13K *veja* Fosfatidilinositol 3-cinase (P13K)
 p21^{Cip1} gene/proteína 268
 ações 269-270, 269F, 270F
 diferenciação e 293
 na ciclina D-CDK4/6 271-272
 fosforilação pela Akt/PKB 270F, 271
 indução mediada pela p53 316, 317, 317F, 327
 papel na senescência celular 365, 365F, 366, 366F
 repressão mediada por Myc 287
 P5-341 *veja* Velcade
 Padrões de fluxo sanguíneo, metástase 636, 637, 637F, 653
 Papiloma(s) 37, 39, 65, 435-436, 436F, 437
 Papilomavírus 65, 65F
 Papilomavírus bovino (BPV), colaboração de onco-genes 185
 Papilomavírus de Shope 65, 65F
 Papilomavírus humano (HPVs) 65, 65F
 carcinomas de células escamosas 678
 desenvolvimento de vacinas 726-727
 indução de câncer 87, 115
 câncer cervical 9F, 9B, 18B, 73, 455, 726-727
 integração no genoma do hospedeiro 73
 oncoproteína E6, aneuploidia 515
 oncoproteína E7
 duplicação dos centrôssomos e aneuploidia 514-515
 interação com RB 275, 284, 514
 receptores de transplantes 678
 veja também tipos específicos
 Papovavírus 66T, 67-68, 68F
 descoberta da p53 e 308-309, 308F
 integração no DNA do hospedeiro 70-73, 72F
 metabolismo de DNA 71
 veja também tipos específicos
 Parada no crescimento, ação da p53 316, 327-329, 327T
 PARP1, quimioterapia e 520F, 520B
 PCNA (antígeno nuclear de célula proliferativa), inibição de p21^{Cip1} 270
 PDK2 *veja* mTOR
 PDK3 46B
 Pedras na vesícula, inflamação e câncer 442, 443F
 Pele
 alterações na pele relacionadas à idade 361F
 câncer *veja* Câncer de pele
 cor 490-491
 disqueratose congênita 388B
 melanina, função protetora 490-491, 491F
 raspagens, anticorpos anti-EGF-R 45F, 45B
 xeroderma pigmentoso 499, 499F
 Penetrância
 mutações em BRCA1/BRCA2 23B, 509
 síndromes familiares de câncer 421-422
 Peptídeo relacionado ao hormônio paratireoideial (PTHrP), metástases de osso 640, 642B
 "peptídeos de fase trocada" 687B
 Perda de heterozigidade (LOH) 247, 253, 409
 câncer colorretal 223, 223F, 409, 409F, 411
 em tecidos histologicamente normais 16-17B, 16F, 17F
 endogamia 218B
 gene/proteína *VHL* 241
 genes de reparo de pareamento errôneo 501, 521
 genes supressores de tumor 221-223
 gene/proteína *NFI* 234
 gene/proteína p53 313
 gene/proteína *Rb* (retinoblastoma) 217-218, 217F, 219-221, 219F, 220F
 hemizigidade 220-221
 hipometilação do DNA 230
 mecanismos 216-218
 conversão gênica 217, 218F
 quebra cromossômica 220-221
 recombinação homóloga 217-218, 217F
 translocação cromossômica 220B
 mutação secundária 2B
 probabilidade 2B
 seqüências flanqueadoras e ligação genética 218
 análise por PCR 224F, 224B
 análise por RFLP 222-223, 222F
 identificação de supressor de tumor 219-220, 220F, 222-223, 222F, 223F, 248
 Perforina
 experimentos com animais *knock-out* 673-674
 mecanismos de assassinato de linfócitos T citotóxicos 665, 666-667F
 Pericito(s) 534-535F
 atração na angiogênese 532
 capilares 560, 562F
 estroma tumoral 530
 interações heterotípicas, tumorogênese 584F
 liberação de angiopoietina-1 532
 liberação de fator de crescimento endotelial vascular 532
 recrutamento, fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) 535B
 Peróxido de hidrogênio 481, 482B
 Peroxissomos, dano ao DNA e 481
 Perturbações endócrinas 28, 375
 Pertuzumab (Omnitarg), mecanismo de ação 709F, 709B
 Pesticidas, câncer e 494B
 PhK, estrutura 743F
 Picnose, apoptose 329, 330F
 Pirimidina (6-4) pirimidinona 484
 PKA (proteína cinase A), estrutura 743F
 PKB (proteína cinase B) *veja* Proteína cinase Akt/PKB
 PKC *veja* Proteína cinase C (PKC)
 Placa metafásica, segregação errônea e 512-513
 Plaqueta(s)
 armazenamento/liberação de PDGF 122, 122F
 cura de ferimentos *veja* Cura de ferimentos
 embolização e metástase 28-29F, 29B
 Pleiotropia
 fatores de transcrição 21
 mutações colaborativas 429, 459
 oncogenes 79
 proteína Myc 290F
 proteínas cinases 125
 PMA (forbol-12-miristate-13-acetato) *veja* TPA (12-O-tetradecanoilforbol-1-3-acetato)
 Podossomos, metaloproteinases de matriz (MMPs) 623, 623F
 Policáριο, fusão celular 210, 211F
 Policitemia familiar, gene/proteína *VHL* 246B
 Polietilenoglicol, fusão celular 210
 Polimerases de verificação 476-477, 476F, 479
 incidência de câncer 477, 477F
 Polimorfismo de tamanho de fragmento de restrição (RFLP) 222-223, 222F
 Polimorfismo
 conjunto de genes humanos 2B, 7F
 definição 7
 susceptibilidade ao câncer e 8B
 único nucleotídeo *veja* Polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs)
 veja também Mutação(ões)
 Polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs)
 análise por PCR 224F
 mdm2 (SNP309) e susceptibilidade ao câncer 8B
 Poliomavírus 66
 antígenos T 19B, 71
 oncogenes colaboradores 18B
 oncogenes múltiplos 427
 Poliovírus 60B
 Polipeptídeo, efeitos na incidência do câncer 407, 407F
 Polipeptídeos, clivagem 19B
 Poliploidia 510
 Pólipos *veja* Adenomas
 Polipose adenomatosa familiar (FAP) 236, 236F, 407
 gene *veja* Gene/proteína *Apr*
 progressão tumoral múltiplas etapas 412-413
 Pontes de anáfase 372, 372F, 394F
 Pontes internucleares, ciclos de ciclos de quebra-fusão-ponte 372F
 interfase 258F, 513-514
 Ponto de quebra cromossômica 110
 Pontos café-com-leite, neurofibromatose tipo 1 233, 233F
 Populações fundadoras 23B
 Populações judias Ashkenazic, mutações na linhagem germinativa de BRCA1/BRCA2 235
 Pott, Perdvall 45
 Poxvírus 46B, 68
 Predição de resposta clínica, desenvolvimento de drogas 744
 Pressão hidrostática, terapias antitumor e 26B, 27F
 Pressão intersticial, terapias antitumor e 26B, 27F
 Pressão seletiva, sucessão clonal 414, 414F
 Primase 374
 Prinomastat, terapia antiangiogênese 578T

- Procarcinógenos 50, 52, 53, 485, 486F
 Procaspases 340
 Procura de câncer 40B, 41B
 Prófase 258, 258F
 Progeria, defeitos no reparo do DNA 524
 Progesterona, promoção de tumor 440-441, 457
 Progressão tumoral 399
 bloqueio na diferenciação 293F, 293B
 câncer colorretal *veja* Câncer colorretal
 carcinógenos da dieta 415-416, 415B
 veja também Carcinógenos; Mutágeno(s)
 cinética 401-402, 402F, 423-424
 “passos limitantes” 401, 424, 461
 passo final e 424B
 complexidade 401, 460
 escala de tempo 400-403, 401F, 402F, 403F
 estresses fisiológicos durante 346-347, 350-351
 expansão clonal *veja* Expansão/sucessão clonal
 histopatológica 403-408, 405F, 406F
 localização de CDKI e 271, 271F
 mecanismos de defesa contra a 362-363, 399-400
 câncer colorretal 238F, 239, 413
 mutações colaborativas e 427-429, 428F, 429T, 434B, 4B9, 460F
 natureza multietapas 332, 399-462, 405F, 406F
 cancerização de campo e 16-17B, 16F, 17F
 níveis de ciclina E e 303-304, 303F
 papel na inflamação 441-444, 442F, 442B, 443F, 454-457
 veja também Inflamação; *vias específicas*
 vias de sinalização 444-452, 451F
 perda/mutação da p53 e 16-175, 17F, 321-322
 princípios de organização 458
 promotores de tumor e *veja* Agentes não-mutagênicos (promotores de tumor)
 seleção darwiniana e 413-416, 414F, 461, 521
 alelos metastáticos 34B
 células-tronco de tumor e 416-420, 420F
 como uma supersimplificação 420-423
 fatores epigenéticos e 415, 423
 validação da 423-424
 taxa
 controle da 415
 papel na promoção de tumor 452-453
 veja também cinética; escala de tempo
 taxas aumentadas de mutação 415, 420, 421-423, 421F, 518
 veja também Transformação; Tumorigênese
 Proliferação celular
 agentes promotores não-mutagênicos e 438, 440B
 Akt/PKB e 181, 181T
 diferenciação vs. 292
 encurtamento de telômeros e 370, 370F, 453
 fúteis na síndrome de Kostmann 440B
 mudanças relacionadas à idade 360, 361F, 361B
 mutagenicidade de 453
 número de gerações celulares necessárias para formar um tumor 362-363, 363F
 potencial proliferativo 357-358, 368
 células em cultura 359-360
 limites 363-364
 veja também Senescência celular; Imortalização
 proteína Myc e 287B
 ras e 149-150
 sinalização intercelular e 120-123
 tumor induzido por vírus 69
 veja também Ciclo celular; Crescimento celular;
 Capacidade replicativa
 Proliferina, angiogênese 567T
 Prolina hidroxilase, regulação do fator de transcrição HIF-1 244F
 Promotores de tumor *veja* Agentes não-mutagênicos (promotores de tumor)
 Prostaglandina E₂, tumorigênese e 450, 457
 Protease(s) 17, 19B
 número de genes 31B
 transição epitelial-mesenquimal *veja* Transição epitelial-mesenquimal (EMI)
 veja também enzimas específicas
 Proteína 1 que interage com a Huntingtina (HIP1), superexpressão do receptor e 132B
 Proteína 1 quimiostática de monócito (MCP-1), secreção pelo estroma tumoral 551-552
 Proteína 14-3-3σ, controle do ponto de verificação mitótico 516-517
 Proteína apoptótica PUMA, expressão mediada por E2F1 324
 Proteína Bak, efeitos pró-apoptóticos 337, 350B
 Proteína Bid, efeitos pró-apoptóticos 337, 343
 Proteína Bim 324, 339, 339F
 Proteína Cbl, superexpressão de receptor de crescimento e 132B
 Proteína cinase A (PKA), estrutura 743F
 Proteína cinase Akt/PKB 126F, 179-181, 20B
 ativação funcional 465, 179-180, 180, 180F
 desregulação no câncer 182-183, 252, 300, 347-348
 efeitos biológicos 180-181
 antiapoptótica 180, 181T, 337, 347-348
 ciclo celular 170-171, 181, 181T, 270F, 284, 300
 crescimento celular e 181, 181T, 182F
 estrutura 205F
 ligação de PIP₃ via domínio PH 179-180, 180F
 regulação de p53 por Mdm2 e 320-321F, 321
 substratos 180-181
 Proteína cinase B (PKB) *veja* Proteína cinase Akt/PKB
 Proteína cinase C (PKC) 177
 PKC-α
 indução por IPA 438, 439F, 445, 445F
 via de sinalização 445-446, 451F
 veja também Fator nuclear-κβ (NF-κB)
 Proteína Crk 165
 veja também Sinalização da Ras
 Proteína de bolso P107 276F, 276B, 278, 295
 câncer e 302
 Proteína de fusão Bcr-Abl 5135, 757-759
 como tirosina cinase 758-759
 estrutura 758F
 imunologia tumoral 681-682
 inibição por Gleevec *veja* Gleevec
 leucemia mielógena crônica 757
 leucemiogênese 759
 mutação, resistência Gleevec 761-762, 761F
 origem 758F
 sinalização 759
 Proteína de fusão PML-RAR, leucemia promielocítica aguda (APL) 732-733
 Proteína de ponto de verificação Bubi, perda 260F
 Proteína fosfatase 2A (PP2A)
 como holoenzima heteromérica 19F, 19B
 necessidade para a transformação 19B, 432, 433
 Proteína gpSS, sinalização autócrina 134B
 Proteína Grb2 165, 172, 173, 173F, 205
 domínios 5H2 171, 187
 domínios 5H3 171-172
 estrutura 205F
 sinalização por integrinas 187-188
 veja também Sinalização pela Ras
 Proteína Mad, complexos Max 285, 285F, 295
 Proteína Max
 complexos Mad 285, 285F, 295
 complexos Myc 285, 285F
 Proteína Miz 1 287, 289
 Proteína mTOR 252
 ativação de Akt/PKB 46B, 786
 como alvo terapêutico 252, 782-787
 veja também Rapamicina
 efeitos de controle de circuito 784-785F, 784-786
 estrutura 782F
 fosforilação da cinase p70B6 784-785F
 fosforilação de 4E-BP1 784-785F
 ligação da rapamicina 782F
 ligação de FKBP12 782F
 Proteína Myc
 ações 290F
 alterações em cânceres 296T
 como fator de transcrição bHLH 285, 285F
 como oncoproteína 284, 287-288, 288F, 289B, 300
 como repressor transcricional 287
 complexos Max 285, 285F
 complexos Miz-1 287
 crescimento celular e 288
 diferenciação celular e 285, 294-295
 efeitos no relógio do ciclo celular 286, 286F, 300
 desregulação de RB 284-288, 291
 expressão de ciclina D2 267, 286-287, 286F
 expressão de Cull1 287
 repressão por CDKI 287
 resistência/independência de TGF-β 287, 289-290, 290-292
 fosforilação 285
 indução da proteína Id 294-295, 300
 indução de apoptose 325, 334-335, 349
 ligação a E-box 285
 meia-vida 162
 pleiotropia 290F
 proliferação celular e 287B
 regulação por hTERT 380B
 sinalização pela proteína de fusão Bcr-Abl 759
 Proteína MyoD 294
 degradação 295
 Proteína MytS 294
 Proteína P130 de bolso 276F, 276B, 278, 295
 câncer e 302
 Proteína p53 307-356
 “guardião do genoma” 328, 517
 ações apoptóticas de 316, 329-331, 334, 355, 390
 modelo de camundongo Rip-Tag 564
 papel de ARF 322F, 323-325
 proteína Arg⁷² 5F, 5B
 terapia com drogas e 42F, 42B
 veja também Apoptose; ARF
 via de sinalização 346F
 via intrínseca 342-343, 345
 ações citostáticas da 316, 327-329, 331
 veja também Relógio do ciclo celular
 ações na mitocôndria 350B
 células de câncer 317, 331-332, 351, 390
 acumulação em 326-327, 326F
 câncer de pele e 318B, 484
 necessidade para mutação 433
 perda da função de fator de transcrição 326
 veja também Gene p53, mutação/perda de função
 como fator de transcrição homotetramérico 312-313, 314F, 325-329, 355
 bloqueio pela Mdm2 318, 319F
 genes-alvo 319F, 327, 327T, 331, 332, 351, 396B, 498, 571-572
 interações com outros TFs 326
 ligação ao DNA 319F, 325
 perda de função 326
 veja também alvos específicos
 como sistema de vigilância celular 317, 350
 descoberta da 308-309, 308F, 309F
 domínios especializados 319F
 envelhecimento e 5F, 5B
 imunocoloração da 326-327, 326F
 imunogenicidade 36B
 indução 315-317, 316F, 355
 dano ao DNA 316, 317-318, 317F, 325-329, 351
 efeitos *downstream* 316, 316F
 estresses fisiológicos 315-316, 329
 sinais de crescimento aberrantes 317-318
 ligação à oncoproteína viral 308-309, 308F, 309T
 modificação pós-traducional da 325-326, 351-352, 353F, 355
 fosforilação 319-320, 320-321F, 351-352
 monoubiquitilação 243B
 papel na senescência celular 365F, 366-367, 366F
 proteínas relacionadas 8B
 veja também p63; p73
 regulação da
 circuito de retroalimentação negativa 326
 Mdm2 vs. ARF 318-323, 319F, 320-321F, 326, 355
 meia-vida/reciclagem proteica 314-315, 318, 354
 papel na fosforilação 319-320, 320-321F, 351-352

- Proteína pró-apoptótica Noxa, expressão mediada por E2F1 324
- Proteína Rad17 de ponto de verificação, perda 260F
- Proteína RB (retinoblastoma) 232, 249-250
- como repressor transcripcional 279F, 280-281, 280F
- desregulação e indução de apoptose 324-325
- diferenciação celular e 292-296
- em células de câncer 284, 296-300, 296T, 297T, 305
- desregulação da fosforilação 278, 297-300
- efeitos de Myc 284-288, 291
- interações da oncoproteína com vírus de DNA 274-275, 275F, 284, 297, 309T
- necessidade para mutação 433
- proliferação descontrolada 296
- superexpressão de ciclina D1 e 297-298
- em células-tronco embrionárias 261B
- evolução 301
- fosforilação (dependente do ciclo celular) 274-276, 274F, 305
- desregulação mediada por Myc 284-288, 291
- desregulação no câncer 278, 297-300
- hiperfosforilação 274, 278, 281, 294
- hipofosforilação 274, 277
- ligação a E2F e 278-282, 279F, 280F, 282F, 302
- ponto de transição R 277-278, 277F
- prevenção por TGF- β 288-292, 611
- reversibilidade 276
- sinização mitogênica e 282-284
- veja também* Ciclo celular; Relógio do ciclo celular
- função no ciclo celular *veja* Relógio do ciclo celular
- papel na senescência celular 365-367, 365F, 366F
- Proteína Rbx1 299F
- Proteína RF4 294
- Proteína ruim, efeitos pró-apoptóticos 337
- Proteína Shc 165
- estrutura 205F
- ligação ao receptor de estrogênio 199B
- sinização 165, 173, 173F, 205
- veja também* Sinização da Ras
- Proteína SHP1, domínio SH2 167, 169B
- Proteína SHP2, domínio SH2 168
- Proteína Skp2, como oncogene 299-300, 299F
- Proteína Smoothened 144F, 145, 154, 196, 206
- desenvolvimento de antagonistas 781-782
- mecanismo de ação da ciclopamina 778-78915
- 780, 781F
- meduloblastomas e 782
- mutação no gene (*SMO*) 196
- veja também* Sinização Hedgehog; Receptor Patched
- Proteína Src
- anticorpos contra 124, 124F, 125F, 125B
- clonagem/seqüenciamento 123-124
- estrutura 166, 166F, 167, 167F, 170-171, 172F, 743F
- veja também* Domínios de homologia Src (SH)
- função de tirosina cinase 123-126, 153-154, 156, 166, 172F
- autofosforilação 124
- circuito de ativação 172F, 172B
- elucidação da 124, 124F, 125B
- especificidade de substrato 126, 127F
- homologia com EGF-R 128, 128F
- imunogenicidade 125B
- sinização GPCR e 191, 191F
- Proteína(s) cinase ativada(s) por mitógeno *veja* Cas-cata da MAP cinase
- Proteína(s) G 146-147, 146F
- câncer e 152B, 191-193, 192T
- GTPases pequenas 182B
- Ras como uma 150-153, 151F, 158
- Rho como uma 181-182
- subunidades 146-147
- Proteína(s) Ras
- ancoramento na membrana 151
- bioquímica 151, 154
- como oncoproteínas
- ativação por PDGF 628
- imunologia tumoral 681, 682
- inadequação como alvo de drogas 738
- sinização pela proteína de fusão Bcr-Abl 759
- transcrição do gene *TSP1* 572, 573F
- diferenças funcionais entre tipos 184
- estruturas 153F, 205F
- alça efetora 174, 174F, 205
- modificação pós-traducional 43F, 43B
- H-Ras 151, 184
- independência de ancoragem e 188
- K-Ras 184
- N-Ras 184
- papel na transformação 155F, 432
- agentes não-mutagênicos (promotores) e 438
- outros genes e *veja* Gene(s) *ras*, mutações cola-borativas
- perda de inibição por retroalimentação 152-153
- sinização autócrina 155, 155F
- veja também* Sinização da Ras
- vias de sinização *veja* Sinização da Ras
- Proteína(s)
- conservação evolutiva 22, 23B
- degradação *veja* Degradação/reciclagem proteica
- estrutura 15, 17F
- alterações oncogênicas em 106
- domínios de ligação de proteína 170F, 171T
- veja também* tipos específicos
- vias de sinização e 204, 205F
- funções/tipos 15-16
- homólogos 23B
- modificação pós-traducional *veja* Modificação pós-traducional
- número de 19B, 160
- ortólogos 22, 23B
- papel do genótipo para o fenótipo 15-19
- reciclagem *veja* Degradação/reciclagem proteica
- seqüência de aminoácidos 15
- síntese 16-17
- controle de Akt/PKB 180
- efeitos da cicloeximida 161
- estimulação pela transdução de sinal 162
- tradução 16, 18F, 176
- veja também* proteínas específicas
- versatilidade 16
- Proteínas adaptadoras 172, 173F
- Proteínas associadas ao telômero 369F, 373-374, 374F
- Proteínas associadas à cromatina, fosforilação 176
- Proteínas cinase(s)
- autofosforilação 124
- cascatas de sinização 175
- como alvos terapêuticos 739, 741, 742-743F
- dependentes de ciclina *veja* Cinase(s) dependentes de ciclina (CDKs)
- estrutura similar 743F
- inibidores, especificidade 746F
- mutação, câncer colorretal 410
- números 203
- papel na transdução de sinal 263
- pleiotropia 125
- receptores de fator de crescimento 124, 126F
- Src 123-126
- tirosina cinases *veja* Tirosina cinase(s)
- veja também* cinases/vias específicas
- Proteínas Cip 268
- veja também* proteínas específicas
- Proteínas de bolso 276F, 276B
- como repressoras transcripcionais 279F, 280-281, 280F
- diferenciação celular e 294
- evolução 301
- ligação ao fator de transcrição E2F 278-282, 279F
- p107 276F, 276B, 278, 295
- p130 276F, 276B, 278, 295
- Rb *veja* Proteína Rb (retinoblastoma)
- “Proteínas de endereço duplo” 193-197, 194F, 195F, 201
- Proteínas de estresse
- extravasamento, imunoevasão 697
- ligação de células matadoras naturais (NKs) 695-696, 696F
- supressão da expressão, imunoevasão 696
- veja também* Estresse fisiológico
- Proteínas de fusão 112, 113F, 114T, 116
- dimerização do receptor de fator de crescimento 139, 139F
- proteína de fusão Bcr-Abl Proteína de fusão Bcr-Abl
- receptor-myc de estrogênio 287, 288F “Futile cycles” 244, 315
- proteínas de ligação a GTP (GTPases)
- proteínas ativadoras *veja* GAPs (proteína ativadora de GTPase)
- trimérica *veja* Proteína(s) G
- veja também* GTPases individuais
- Proteínas de resistência a múltiplas drogas (MDR) *veja* Genes/proteínas mdr
- Proteínas DP, ligação do fator de transcrição E2F 279F, 280
- Proteínas embrionárias, imunologia tumoral 683
- proteínas Id 294-295, 300
- Proteínas indutoras de tumor *veja* Oncoproteína(s)
- Proteínas INK4 368
- veja também* proteínas específicas
- Proteínas Kip 268
- veja também* proteínas específicas
- Proteínas morfogenéticas do osso (BMPs), metástases no osso 640
- Proteínas reguladoras de complemento ligadas à membrana (mCRPs), imunoevasão 701, 702F, 703
- Proteínas regulatórias de genes 21-22, 22F
- veja também* Fatores de transcrição; proteínas específicas
- Proteoglicanas
- estroma desmoplásico 546
- matriz extracelular 145B, 532
- substrato para metaloproteínas de matriz 622
- Proteômica, diagnóstico do câncer 731-732
- Proteossoma(s)
- degradação de ciclina 265
- degradação I κ B 775-776
- estrutura 243F, 243B
- inibidores 769, 772-776
- caquexia associada ao câncer 772
- proteínas tóxicas intracelulares 776
- veja também* Velcade
- ubiquitilação (ubiquitinação) e 242-243B, 243F
- vias de sinização celular 773
- Proto-oncogene *LMO2*, leucemia de células T induzida por terapia gênica 87B
- Proto-oncogene(s) 78, 79, 86
- anotação/terminologia 108
- aquisição por retrovírus 77-78, 78F, 78B, 80, 81T, 103, 115
- ativação oncogênica 103, 105-107, 113, 115
- alterações estruturais em proteínas 106, 111-112
- amplificação gênica 100, 107, 107F, 108, 116
- apoptose 332
- mutações somáticas 105, 105F, 114
- mutagênese insercional 82-84, 83F, 85B, 85T, 89, 108
- por carcinógenos/mutágenos 97-98, 105-106
- por retrovírus 79-80, 82-84, 86, 89, 103, 108, 116
- translocações cromossômicas 109-110, 109F, 111T, 112, 113F, 114, 114T, 116
- controle transcricional 103
- eventos mutacionais únicos 424-427, 429
- genomas de vertebrados 80-82
- veja também* genes específicos
- Pró-vírus 74, 89
- endógenos 92, 94B
- Pulmão
- alterações em p16^{ink4A} em tecidos histologicamente normais 17B
- câncer *veja* Câncer de pulmão
- desenvolvimento do epitélio 29-30

Q

Quebras dupa-fita (DSBs) 524
 anormalidades cromossômicas devido a 511
 BFB ciclos 390, 391
 forquilha de replicação e 479, 480F, 505
 histonas e 12-13F, 125, 523F, 523B
 indução da p53 317
 Indução de apoptose 390
 indução pela hidroxiúria 505
 induzidas pelo reparo de pareamento errôneo
 perda de heterozigotidade e 220B
 reparo
 dirigido por homologia (HDR)
 incorreto 506
 ligação de extremidades não-homólogas 508-509, 509F
 resposta a ciclos BRCA1 505, 506F
 Queratinócitos
 animais transgênicos
 mutações em células-tronco 469
 tumorigênese de PDGF em enxertos 548
 modificações na proliferação relacionadas à idade 361F
 proteção do DNA 490-491, 491F
 reciclagem 466
 Queratoses, fotoprodutos do DNA 484
 Questões raciais *veja* Etnicidade/raça, risco de câncer e
 Química combinatorial 44F, 44B
 Quimiocinas tecido-específicas, metástase 637
 Quimioterapia anti-PARP 520F, 5205
 Quimioterapia
 alquilação de bases guanina 523
 classificação tumoral e 415
 combinação de Herceptina 705-706
 enzimas de reparo de DNA e 520F, 520B
 desenvolvimento de drogas 522
 eficácia e 523
 MGMT 494, 523
 inativação da supressão tumoral e 252
 mecanismo de ação, "catástrofe mitótica" 734, 734F
 polimorfismos na p53 e 42F, 42B
 resistência *veja* Resistência a drogas
 sinergia com Velcade 773, 773F
 variações individuais no metabolismo e 493B
 veja também Desenvolvimento de drogas; *terapias específicas*

R

Rabdomiossarcoma 32F
 Rac GTPase(s) 182, 205
 especificidade celular 629-630
 metástase 627, 628F
 RAD51 505, 507
 Radiação ionizante *veja* Irradiação X
 Radiação
 experimentos de mutagenese 48
 indução câncer 46, 56, 92
 mecanismo de mutagenese 52
 veja também tipos específicos
 Radicais hidroxil 481
 Radicais livres
 catadores 491
 espécies de oxigênio *veja* Espécies reativas de oxigênio (ROS)
 produção por radiação ionizante 484
 Radioimunotoxinas 173
 Radioterapia
 "catástrofe mitótica" 734, 734F
 terapia antiangiogênese 580, 581F
 Raf cinase 174-176, 198, 205
 ativação pela Ras 174
 como oncoproteína 174
 efeitos *downstream* 175-176
 efeitos indiretos em 321
 em câncer colorretal 410
 indução IEG 176
 mutantes BRAF 184, 198
 veja também Cascata da MAP cinase
 via 174-175, 175F
 RAG-1/RAG-2
 expressão de anticorpos 674
 expressão do receptor de células T 674, 674F
 modelos animais *knock-out* 674-675
 células T matadoras naturais 674
 tumores quimicamente induzidos 675, 676F
 Ral-GEFs 183-184, 205-206
 via da Rho e 184
 Rapamicina 782-787
 astrocitomas 786-787
 derivativos 786-787
 efeitos imunossupressivos 783-784
 em transplantes de órgãos 783-784
 estrutura 782F
 história da 782
 ligação de FKBP12 783F, 784
 ligação de mTOR 782F
 redução da desordem pós-linfoproliferativa 784
 sarcomas 784-785F, 786-787
 testes clínicos 784-785F
 RAR- β *veja* Receptor do ácido retinóico β (RAR- β)
 Ras-GAP 134
 domínio SH2 168, 169
 NF1 como 234
 Reação em cadeia da polimerase (PCR)
 análise de metilação de promotor 3F, 3B
 diversidade genética de genomas de tumor 421
 ensaio TRAP 377F
 identificação da perda de heterozigotidade 224F, 224B
 Reação em cadeia da polimerase específica para metilação (MSP) 3F, 3B
 Rearranjos de genes, união de extremidades não-homólogas (NHEJ) 509B
 Receptor da eritropoietina (EPO)
 hiperativo 169B
 Jaks (Janus cinases) 141, 143, 157, 186
 regulação de SHP1 169B
 Receptor da insulina, estrutura 129F
 Receptor da trombopoietina (IPO), Jaks e 141, 143, 157, 186
 Receptor de ácido retinóico- β (RAR- β)
 alterações em tecidos histologicamente normais 17B
 lesões pré-malignas na boca/garganta 733
 metilação do promotor *RAR β 2* 229T, 231-232
 Receptor de estrogênio (ER)
 ligação da ciclina D 267B
 mitogênese do câncer de mama 199B, 267B
 proteína de fusão Myc 287, 288F
 Receptor do fator 1 de crescimento semelhante à insulina (IGF-1 R)
 antagonistas seletivos 45B, 45T
 ativação da fosfatidilinositol-3 cinase 178
 estrutura 45B, 129F
 hiperinsulinemia, obesidade e câncer 10B
 Receptor do fator de crescimento de fibroblastos (FGF-R) 129F, 138F, 138B
 Receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF-R) 133
 ancoramento a Src 172F
 ativação da proteína Rho 628
 ativação de Ras 628
 doença mieloproliferativa 762
 especificidade ao tipo celular 133
 estrutura 129F
 ligação a Gleevec 759, 762
 metástase e
 meduloblastomas metastáticos 762
 metástases de osso 640
 síndrome hipereosinofílica 762
 vias de sinalização 628-629
 Receptor do fator de crescimento epidermal (EGF-R) 111, 127
 antagonistas 45F, 45B, 744F, 745
 alcance do tumor 765-769
 anticorpos 45F, 45B, 708-709B

raspagem na pele 45F, 45B
 sinalização na pele e 752
 testes clínicos fase I 751-752, 753F
veja também anticorpos/drogas específicas
 câncer de pulmão de células não-pequenas (NS-CLC) 768
 como alvo de tratamento 455
 como oncoproteína 45B, 129-132, 130F, 155
 formas truncadas 111, 112F, 130F, 132, 757
 funcionamento independente de ligante 130-131, 131 F, 137
 superexpressão 45B, 1325, 137, 708B, 762
 dimerização 137, 138F, 138B, 139
 estrutura 127-128, 128F, 129F, 205F
 função da tirosina cinase 126-132
 glioblastoma multiforme 757
 homologia com erbB 129, 130F, 157
 homologia *sevenless* 165
 homologia Src 128, 128F
 importância no câncer 766
 ligação a Iressa 745
 mecanismo de ação 766
 resistência Gleevec e 762
 sinais antiapoptóticos 766
 sinais mitogênicos 766
 supressão por RNAs pequenos de interferência (siRNAs) 770-771F
 transdução de sinal
 domínio SH2 e 168, 168F
 Ras e 155, 155F
 retroalimentação negativa 198, 198F
 transfosforilação 136F, 157
veja também Gene/proteína *erbB*
 Receptor do fator de crescimento transformante β 143, 154, 157, 194F, 289
 conteúdo no genoma humano 146
 estrutura 143, 143F
 inativação 292
 fibroblastos 548, 550F
 instabilidade de microssatélites 502-503, 502F
 serina/treonina cinase 289
 sinalização 197, 289
 veja também Smad(s)
 Receptor do fator de necrose tumoral (TNF-R) 343, 344F, 349
 Receptor do fator estimulante de colônia de macrófago (M-CSF), estrutura 129F
 Receptor do hormônio estimulador de tireóide (TSHR), ativação independente de ligante 192
 Receptor do interferon- γ , expressão em células tumorais 673
 Receptor efrina, estrutura 129F
 Receptor Fas 343, 345T, 346F
 células endoteliais 571, 573F
 imunoevasão e 697, 701
 supressão da angiogênese 571, 573F
 veja também Fas ligante (FasL)
 Receptor Fit-1 *veja* Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)
 Receptor inibitório de matadora (KIR), células matadoras naturais (NKGs) 695, 695F
 Receptor Notch 143-144, 154, 157
 conteúdo no genoma humano 146
 estrutura 144F
 ligantes 143, 195
 via de sinalização 194F, 195-196, 206
 desregulação no câncer 195F, 196
 Receptor *Patched* 144-145, 144F, 154, 157, 194F, 196-197, 206
 associação com a proteína *smoothed* 144F, 145, 154, 196, 206
 conteúdo no genoma humano 146
 gene *veja* Gene do receptor *PTCH* (*patched*)
 veja também Proteína *Smoothed*
 via de sinalização 144-145, 144F, 194F, 777-782, 778-779F
 meduloblastomas 778-779F
 ocorrência no câncer 779-780

- veja também* Sinalização Hedgehog
- Receptor tirosina cinases (RTKs) 154
- alterações estereoquímicas 139-140
- associações com câncer 129T, 133T, 140B, 197
- cânceres familiares 140
- comparação com integrinas 188
- comunicação intracelular 151, 166-171, 197
- dimerização de 136-137, 137F, 153-154, 157
- independente de ligante 137-139, 157
- mutações estruturais 138-139, 139F
- superexpressão e 137-138, 157
- EGF-R como 126-132, 155
- estrutura 129F
- interações receptor-ligante 136
- números no genoma 140
- relação com Ras 155
- Src como 123-126, 154
- transfosforilação *veja* Transfosforilação
- veja também* proteínas específicas
- Receptor(es) de fator de crescimento 119-158
- como oncoproteínas 129-132, 131F
- desregulação 111, 112F, 129-132, 130-132, 131F, 154, 197-198
- independência de ligante 130-131, 131F, 137-139
- sinalização autócrina 131F, 133-135, 134B
- superexpressão e 132B, 137-138, 197-198
- dimerização 136-137, 137F, 138F, 138B, 153-154, 157
- independência de ligante 137-139, 157
- mutações estruturais 138-139
- superexpressão e 137-138, 157
- funções de proteínas cinases 124, 126F, 166
- tirosina cinases *veja* Receptores tirosina cinases (RTKs)
- transfosforilação 135-140, 166
- interações receptor-ligante 136
- mobilidade lateral 136
- Receptores comuns envolvidos na patogênese tumoral 129T, 133T
- receptores não-RTK 141, 143-147
- veja também* receptores específicos
- vias de sinalização intracelular 151, 161, 186-188
- fosforilação de tirosina 166-171
- veja também* Comunicação intracelular
- Receptores (superfície celular) *veja* Receptores de superfície celular; *tipos específicos*
- Receptores acoplados à proteína G (GPCRs) 146-147, 158, 191
- codificada por vírus 192T
- estrutura 146F, 191
- sinalização 146-147, 146F, 191, 191F, 206
- desregulação no câncer 191-193
- veja também* vias intracelulares específicas
- Receptores de células T (TCRs) 658
- células T regulatórias (T_{reg}) 669
- expressão de RAG-I/RAG-2 674, 674F
- ligação de *Herceptina* 40B
- Receptores de interferon (IFN)
- experimentos de expressão em células de tumor 673
- Jaks (Janus cinases) 186
- Receptores de morte 343-344, 344F, 355
- ativação de caspase 343, 344F
- células de câncer e 352
- “domínio da morte” 343
- imunoevasão e 697
- ligantes 343, 344F, 345T
- Receptores de superfície celular 120, 160
- célula tipo-específica 201
- controle de retroalimentação negativa 198, 198F, 202
- ECM e 147-150
- fatores de crescimento *veja* Receptores de fatores de crescimento
- inibição
- Herceptina* 707, 708-709B, 709F
- Omnitarg (pertuzumab) 709F
- interações receptor-ligante 136, 198
- metástase 594
- transdução de sinal *veja* Transdução de sinal
- veja também* Comunicação intercelular; tipos específicos
- Receptores Fc 706, 706F
- Receptores *Frizzled* 145-146, 145F, 154, 157-158, 189
- conteúdo no genoma humano 146
- via de sinalização *veja* Sinalização Wnt
- Receptores nucleares de hormônio, como alvos proteicos potenciais para o desenvolvimento de drogas 737-738
- Receptores serpentina *veja* Receptores acoplados à proteína G (GPCRs)
- Receptores tirosina cinase (TRKs) *veja* Receptores tirosina cinase (TRKs)
- Receptores Trk
- dimerização 138B
- estrutura 129F
- fusões gênicas 139, 139F
- Recombinação homóloga
- construção de animais transgênicos 250-251F, 250B
- perda de heterozigotidade (LOH) 217-218, 217F
- reparo *veja* Reparo dirigido por homologia (HOR)
- Recombinação não-homóloga 505-506
- Recombinação
- homóloga *veja* Recombinação homóloga
- não-homóloga 505-506
- veja também* Mitose
- Redundância, genômica 4
- Região homogeneamente corada (HSR) 13F, 13B, 107F, 107B, 108, 116
- Regiões hidrofóbicas 127, 128F
- Regiões justamembrana, receptores Kit 140B
- Registros de câncer, malignidade associada à transplantação 305
- Rejeição de enxertos 670-671, 671 F
- Rejeição de tumor 70
- Relógio do ciclo celular 255-306, 256F
- CDKs *veja* Cinases dependentes de ciclina (CDKs)
- ciclina *veja* Ciclina(s)
- definição 256
- efeitos de Myc 267, 284-288, 286, 286F, 288F, 291
- evolução 301
- experimentos com animais transgênicos 303B
- ligações com a diferenciação celular 292-296, 305
- movimento unidirecional 265, 282F
- mudanças moleculares nos cânceres humanos 296T, 297T, 302
- alterações no ponto de transição R 297F, 515
- desregulação de RB 296-300
- mutações colaborativas 428-429
- oncogenes/proteínas e 256
- papel da proteína Rb 273-276, 305
- ciclo de fosforilação 274-276, 274F
- desregulação mediada por Myc 284-288, 291
- efeitos da perda/mutação 278
- estresse fisiológico e 276
- ligação de E2F e 278-282, 279F, 280F, 282F, 302
- ponto de transição R 274, 275, 277-278, 277F, 297F, 515
- TGF- β e 288-292
- vias de sinalização mitogênicas 282-284
- pontos de verificação 259-261, 259F, 302, 304
- decatenação 260
- dependente de ancoragem 45
- fase M 260, 516-517
- perda do 45, 260-261, 260F
- segregação e 513
- proteína cinase Akt/PKB 170-171, 181, 181T, 270F, 284, 300
- quiescência vs. crescimento 256, 261-262, 301, 304-305
- papel de E2F 278-282, 280F, 282F
- ponto de transição R 262, 262F, 267, 272F, 273, 274, 277-278, 297F, 301, 304
- retroalimentação positiva 281, 282F
- sinais externos 256-261, 270F
- mitógenos 255, 270-271, 270F, 277F, 282-284
- responsividade a 262F, 267-268
- TGF- β 255, 257, 268-269, 269F, 270F
- supressores de tumor e 256
- veja também* componentes específicos
- “Relógio generacional” 364, 368
- veja também* Estresse fisiológico; Telômero(s)
- Reparo acoplado à transcrição (ICR) 497
- Reparo de DNA 14-15, 226, 454, 493-499, 517
- câncer tecido-específico e 496B
- clonagem e 14F
- defeitos
- herdados 499-505, 501T, 521-522
- progeria (envelhecimento acelerado) 524
- quimioterapia e 520F, 520B
- susceptibilidade ao câncer e 24F, 24B, 505-509, 519
- veja também* Síndromes de câncer familiar; *problemas específicos*
- envelhecimento e 524
- enzimas desalquiladoras 494-496, 495F
- excisão de bases 496, 497F, 519, 524
- excisão de nucleotídeos *veja* Reparo por excisão de nucleotídeos (NER)
- genes induzidos por p53 327T, 328
- HNPCC 416
- mecanismo ALT e 384
- mecanismos de resistência a drogas 756
- natureza predisposta a erro 471
- números de genes 522
- reparo de pareamento errôneo *veja* Reparo de pareamento errôneo (MMR)
- Reparo dirigido por homologia *veja* Reparo dirigido por homologia (HDR)
- reparo predisposto a erro 498-499, 498F
- defeitos 500
- replicação de DNA e 477-479, 498-499, 498F
- veja também* Dano ao DNA; *mecanismos específicos*
- Reparo de pareamento errôneo (MMR) 477-479, 478F, 493-494
- defeitos 501-505
- em HNPCC 416, 501-502
- genes/proteínas inativados por 503T
- instabilidade de microssatélite 477-478, 502-503, 502F
- mutação somática 503
- perda de heterozigotidade 501
- silenciamento gênico 503-504, 504F
- DNA distorcido e 479
- DNA repetitivo e 477-478, 502-503, 502F
- veja também* Instabilidade de microssatélite (MIN)
- Instabilidade de microssatélite 687B
- manutenção ALT de telômero e 384
- Reparo dirigido por homologia (HOR) 505-509, 524
- BRCA1/BRCA2 e 505, 507, 524
- mecanismo 508F
- RADS1 505, 507
- síndrome da quebra de Nijmegen 508
- tempo 507
- Reparo genômico global 498, 519
- Reparo por excisão de bases (BER) 496, 497F, 519, 524
- Reparo por excisão de nucleotídeos (NER) 496-498, 497F
- ativação de p53 498
- complexo multienzimático 496
- defeitos
- p53 e 519
- síndrome de Cockayne 500-501
- iniciação 496-497
- reparo acoplado à transcrição 497
- reparo de foto-danos 23B
- reparo genômico global 498, 519
- Replicação da fita de DNA imortal (conservada) 471-475, 472-473F, 475B
- Replicação de DNA suscetível a erro (reparo) 498-499, 498F
- xeroderma pigmentoso 500
- Replicação de DNA

- ciclo celular 257
 inibição de p21^{Cip1} 270
veja também Ciclo celular
- clonagem e 14F
- conversão gênica 217, 218F
- dano ao DNA devido à 328, 475-479
 instabilidade de microsatélites *veja* Instabilidade de microsatélite (MIN)
 quebras dupla-fita *veja* Quebras dupa-fita no DNA (DSBs)
- erros 471, 475-479, 524
 reparo de pareamento errôneo do *veja* Reparo de pareamento errôneo (MMR)
 taxa 475, 524
 verificação 476-477, 476F, 477F, 479
- iniciadores 374, 375F
- metilação seguindo 227, 227F
- modelo da fita conservada (imortal) 471-475, 472-473F, 475B
- predisposto a erro (reparo de DNA) 498-499, 498F, 500
- problema da replicação das extremidades 374-375, 375F
veja também Telômero(s)
veja também DNA polimerase(s); Síntese de DNA
- Repressores 144F
 Myc como 287
 proteínas de bolso como 279F, 280-281, 280F
- Resistência a drogas 755-757, 756T, 793
 bomba de efluxo de múltiplas drogas 471, 756, 757F
 câncer de ovário 755
 experimentos de desligamento de oncogene 755
 mecanismos de reparo de DNA 756
 metabolismo de drogas 756
 neutralização da apoptose 756
 resistência a múltiplas drogas (MDR) 756
 tipos de câncer 755
veja também drogas individuais; tipos específicos de cânceres
- Resposta de enxerto contra tumor, transplante de medula óssea (BMT) 713
- Resposta imune adaptativa 659-665, 670F
- Resposta imune celular 658, 663-665, 670F
veja também células específicas
- Resposta imune humoral 656-657, 670F, 720, 722
veja também Anticorpos
- Resposta imune inata 659, 666-668, 670F
veja também Células matadoras naturais (NKC's)
- Resposta imune adaptativa 659-665, 670F
 anticorpos anti-p53 36B
 celular 658, 663-665, 670F
 Contra "si" *veja* Doenças auto-imunes
 humoral 656-657, 670F, 720, 722
 inata 659, 666-668, 670F
 síndromes paraneoplásicas 37F, 37B
veja também Anticorpos; tipos celulares específicos
- Retina 35F, 214F
 desenvolvimento 252F
 vascularização na síndrome de Von Hippel-Lindau 244F
- Retinoblastoma 35F, 214-216, 214F
 análise de cariótipo 219, 219F
 cinética de aparecimento 216F
 especificidade de tecido 522
 esporádico (unilateral) 214
 bilateral vs. 215F, 216F
 cinética de segunda ordem 215, 216F
 familiar (bilateral) 214, 224
 cinética de primeira ordem 216F
 osteossarcoma e 214, 221
pedigree 215F
 unilateral vs. 215F, 216F
 gene *veja* Gene *Rb* (retinoblastoma)
- Retrovírus 75
 ativação de proto-oncogene 79-80, 86, 89, 103
 mecanismos 82-84, 83F
 capacidade codificante 75
 como vetores para a terapia gênica 79
 endógenos 94B
 ativação 92-93
 origens 94-95F
 estrutura do genoma 62F, 76F
 experimentos de transfecção 97B
 integração no genoma do hospedeiro 73-75
 mutagenese insercional 82-84, 83F, 85B, 85T, 86, 89, 108
 oncogenes 86, 113
 aquisição 77-78, 78F, 78B, 80, 81T
 dominância 210, 212-213
 ocorrendo naturalmente 84
 relação com oncogenes celulares 75-77, 98-104, 99F, 100T
 transcrição reversa 74, 74F, 89
veja também Transcriptase reversa; tipos específicos
 vírions 62F
 vírus de transformação lenta 82-84
- Retrovírus endógenos 92-93, 94B
 origens 94-95F
- RhoGDI-2 (inibidor da associação de Rho com o nucleotídeo guanina-2) 6431, 644-645
- Ribossomos 16
- Risco de câncer 43
 fatores afetando 45-46, 47T
 gravidez, risco de câncer de mama e 20-1F, 20B
 variação entre populações 43-45
veja também fatores ambientais; Raça/Etnicidade, risco de câncer e; Variação geográfica
- Rituxan 710-711, 711F, 712B, 790
- RNA anti-senso 265, 381
- RNA mensageiro (mRNA), processamento 18-19, 18F
splicing alternativo 18F, 19B, 151, 321F
- RNA nuclear heterogêneo (hnRNA) 18F, 19
- RNA pré-mensageiro 18F, 19
- RNA
 análise por *Northern blot* 99F
 mutantes da RNA helicase 38B
 processamento 18-19, 18F
splicing alternativo 18F, 19B, 151, 321F
 RNA polimerase II 18F, 22F
 ligação ao promotor 21
 RNA polimerase(s) 19B, 60B
veja também tipos específicos
 síntese 17-18, 18F
veja também Transcrição
 síntese proteica a partir de 16, 18F
 transcrição reversa 74, 74F
veja também Transcriptase reversa
 uso por retrovírus 74F
- RNAs pequenos de interferência (siRNAs), supressão de EGF-R 770-771F
veja também Vírus do sarcoma de Rous (RSV)
- Rubin, Harry 62-63
- S**
- Sacarina, carcinogenicidade 456B
- Salmonella, teste de Ames 49-50, 50F
- Sarcoma de Kaposi
 como doença familiar 88B
 herpesvírus humano-8 (HHV-8) 678
 infecção por HIV/AIDS 88B
 redução 678
 interações heterotípicas, tumorigênese 582B
 receptores de transplante 678
 sinalização autócrina 134
 sinalização pela proteína G 193
 terapia com interferon 576-577
- Sarcoma meningeal 32F
- Sarcoma Meth A 38B
- Sarcoma venéreo transmissível canino (CTVS) 35B
- Sarcoma(s) 31
 genes/proteínas do ciclo celular 297T
 mecanismo ALT de manutenção telomérica 385
 rapamicina 784-785F, 786-787
 síndrome de Li-Fraumeni 333F
 transmissível 35B
 vírus do sarcoma de Rous *veja* Vírus do sarcoma de Rous (RSV)
- Satélite DNA *veja* DNA repetitivo
- Schwannoma 32, 35F
- Seleção natural 5, 8B
- Seletividade biológica, teste do modelo celular 747
- Senescência celular 397
 "aparência de ovos fritos" 359, 360F
 células em cultura 359-360, 359F, 360F
 controvérsia 367, 395
 crise celular e 364, 368, 368F
in vivo vs. *in vitro* 367, 395
 inibidor-1 do ativador de plasminogênio 396B
 marcadores 12-13F, 12B, 367, 367F
 prevenção do antígeno large T 366F, 367
 prevenção Mdm2 320
 processos autônomos vs. não-autônomos 396B
 relógio generacional 364, 368 *veja também* Estresse fisiológico; Telômeros
 supressores de tumor e 365-367, 365F, 366F
 telômeros/telomerase e 368-372, 381 F, 381B
veja também Telomerase; Telômero(s)
veja também Imortalização; Capacidade replicativa
- Separador celular ativado por fluorescência (FACS) 416-418, 416F, 418F, 471
- Seqüência adenoma-carcinoma 406-407, 406F, 407F, 501
- Seqüências *Alu* 104F, 104B
- Seqüências gênicas regulatórias 22F
 acentuadoras 21, 22F
 promotoras *veja* Elementos promotores
- Serina/treonina cinases 177, 179
 dependentes de ciclina *veja* Cinase dependente de ciclina(s) (CDKs)
 receptor do fator de crescimento transformante β (TGF- β) 289
veja também cinases específicas
- Siah, indução da p53 328
- Silenciamento gênico
 análise de seqüências e 423
 genes de reparo de pareamento errôneo 503-504, 504F
 metilação CpG 228-229
- Sinais inibitórios de crescimento
 interações heterotípicas 531, 531F
 TGF- β *veja* Fator de crescimento transformante β (TGF- β)
veja também Genes supressores de tumor (TSGs); sinais específicos
- Sinais promotores de crescimento
 aberrantes, indução de p53 317-318
 fatores de crescimento *veja* Fatores de crescimento mitógenos *veja* Mitógeno(s)
veja também sinais específicos
- Sinalização autócrina 131F, 133-135, 134B, 134T, 197
 fator de crescimento transformante α (TGF- α) 155, 155F
 prostaglandinas 450
 sinalização pela proteína-G e 192
 terapias anticâncer e 135B
 TNF- α 445-446
- Sinalização celular dependente de ligante 130-131, 131F
 fusões gênicas 139, 139F, 157
 mutações pontuais 138-139
 sinalização pela proteína G 192
 superexpressão de receptor 137-138, 157
- Sinalização celular
 através da membrana *veja* Transdução de célula-célula de sinal *veja* Comunicação intercelular
 complexidade genética 203
 conectividade cruzada 202, 202F

- evolução 199, 200
 intracelular *veja* Comunicação intracelular; Moléculas de sinalização
 mecanismos de retroalimentação negativa 198, 198F, 202
 mecanismos de retroalimentação positiva 202, 281, 282F
 regulação do crescimento/divisão 119-120, 120F
veja também vias específicas
 vias *veja* Vias de sinalização
 Sinalização da Ras 154-155, 164-165
 células de câncer 182-183, 183T
 câncer colorretal 410
 fenótipo e 176
 necessidade para mutação 432
 superativação 152-153, 152B
 como tomada binária 150-153, 154-155, 182B
 convergência 188
 efeitos indiretos na p53 321
 fosforilação de RB e o ciclo celular 283-284, 283F
 função da proteína G (GTPase) 150-153, 151F, 154, 158
 ciclo de sinalização 151F
 circuito de retroalimentação negativa 152, 153
 NF1 (neurofibromina) e 234, 235F
 retroalimentação negativa 152, 153, 198
 sinalização autócrina e 155, 155F
 via *upstream* 165, 197-198, 204-205
 sinalização da integrina e 149-150, 188
 sinalização Notch sinalização e 144
 vias *downstream* (efetoras) 173-176, 175F, 177F, 184F, 197, 198, 203F, 205-206
 alça efetora e 174, 174F, 205
 complexidade 173-176
 fosfolípidos inositol/PKB 176-1873, 177F, 205
 moléculas efetoras 174, 184
 Raf e 173-176, 175F, 198, 205
 Ral-GEFs 183-184, 184F, 205-206
 veja também componentes/vias individuais
 vírus de DNA e 18B
 Sinalização endócrina 133
 veja também Hormônio(s)
 Sinalização Hedgehog 144-145, 144F, 194F, 196-197, 778-779F, 779-780
 câncer de próstata 780
 câncer pancreático 780-781
 desregulação no câncer 195F
 mecanismo de ação da ciclopamina 780, 782F
 proteína Gli e 196
 Sinalização parácrina 133
 prostaglandinas 450
 TNF- α 445-446
 Sinalização Wnt 145-146, 145F, 157-158, 189-191, 206
 migração de enterócitos 238F, 239
 no câncer 190-191
 veja também β -catenina
 Síndrome da quebra de Nijmegen (NBS) 508
 Síndrome de Cockayne 500-501
 Síndrome de Costello 142B
 Síndrome de Kostmann 440F, 440B
 Síndrome de Li-Fraumeni, mutações na p53 333, 333F
 síndrome de Von Hippel-Lindau 241, 244F
 gene *veja* Gene/proteína VHL
 Síndrome do nevo da célula basal (BCNS), mutações PTCH 779-780
 Síndrome hipereosinofílica 762
 Síndrome mielodisplásica (MDS) 492
 Síndromes familiares de câncer
 defeitos no reparo de DNA 499-505, 501T, 521-522
 especificidade de tecido 522
 mutações no receptor da tirosina cinase 140, 142B
 mutações supressoras de tumor 224, 226, 247
 mutações na p53 332-333, 333F, 333B
 penetrância 421-422
 progressão múltiplas etapas e 413
 veja também doenças específicas
 Síndromes herdadas de câncer *veja* Síndromes familiares de câncer
 Síndromes paraneoplásicas 37F, 37B
 Síntese da fita líder de DNA 374-375, 375F
 Síntese da fita retardatária de DNA 374-375, 375F
 Síntese de DNA
 análise de mutagenicidade “não-agendada” 525
 fita líder vs. fita descontínua 374-375, 375F
 veja também DNA complementar (cDNA); Replificação do DNA
 Síntese de prostaglandina 448F, 450-451, 450F, 451F, 457
 Sirolimus *veja* Rapamicina
 Sistema imune 656-659, 670F
 células inflamatórias 447
 estimulação *veja* Imunoterapia
 evasão do *veja* Imunoevasão
 funções 656
 manipulação *veja* Imunização passiva
 mecanismos de reconhecimento 656
 micrometástases 646
 produtos oxidativos 482B
 tumorigênese e 70B
 veja também Resposta imune; Tolerância imunológica; Imunologia tumoral
 Sítios abásicos 482
 Sítios apirimídicos 482
 Sítios apurínicos 482
 Sítios de ligação ao antígeno 225, 656, 657F
 Skyl, estrutura 743F
 Smac/DIABLO, inativação por IAP 340, 341, 341F
 Smad 2 289, 291
 Smad 3 289
 papel na função Myc/TGF- β 291F
 repressão da transcrição de myc 290
 Smad(s) 197, 289
 controle transcrricional do proto-oncogene myc 290, 291F
 mutações 291
 veja também tipos específicos
 Smad4 (OPC4/MAOH4)
 Sobrevivência celular
 fatores extracelulares 347B
 fatores tróficos 345-346
 veja também mecanismos antiapoptóticos
 Son of sevenless gene/proteína *veja* Gene/proteína sos
 Soro 122
 Southern blotting 99F, 221F, 222F
 Splicing 18F, 19
 alternativo *veja* Splicing alternativo
 splicing alternativo 18F, 19B
 de p16^{ink4A} 321F
 genes/proteínas ras 151
 SseCKs, genes supressores de metástase 643T, 643T
 STATs 185-186, 185F, 206
 ativação constitutiva no câncer 186, 186F
 domínios SH2 185
 expressão da ciclina D3 267
 veja também Jaks (Janus cinases)
 STI-571 *veja* Gleevec
 SU11248, terapia para tumores de estroma gastrin-testinal (GISTs) 763-764
 SU5416, terapia antiangiogênese 577-578, 578T, 579, 579F
 SU6668, terapia antiangiogênese 577-578, 579, 579F
 “Substratos de morte” 341 F
 Sulindac, prevenção/proteção ao câncer 445
 Suporte sanguíneo, estroma tumoral *veja* estroma tumoral
 T
 Tabaco
 câncer de pulmão e 34, 46, 461
 câncer nasal e 45
 carcinógenos 439, 487
 eventos de desaminação 480
 veja também Tabagismo
 Tabagismo
 alterações de p16^{ink4A} em tecido histologicamente normal 175
 associação com câncer de pulmão 46, 461
 carcinoma em células pequenas do pulmão e 34
 passagem do tempo e 400, 401F
 veja também Câncer de pulmão
 associação com o câncer de bexiga 105-106
 promoção citotóxica de tumor 439-440
 Talidomida, terapia antiangiogênese 578T
 Tamanho celular, divisão celular, tipos celulares e risco de câncer 433, 434F
 Tamoxifen 199B, 738
 Tarceva 455, 766-769
 anticorpos anti-receptor EGF vs. 766
 especificidade 746F
 estrutura 766F
 inibição do receptor de EGF 744F, 745
 mecanismo de ação 766, 766F
 “dependência de oncogene” 770-771B
 TATAs *veja* Antígenos de transplantação associados a tumor (TATAs)
 Taxa de sucesso, desenvolvimento de drogas 754-755
 Taxas de mortalidade 401, 726, 726F
 câncer de mama 726F
 incidência vs. 728, 728F
 varredura vs. efeitos da terapia 40B
 câncer de próstata, tratados vs. não-tratados 41B
 câncer vs. doença cardiovascular 47F, 47B
 efeitos da varredura/prevenção vs. terapia 40B
 melanoma 789F
 mortalidade cardiovascular vs. 47F, 47B
 variações geográficas 44-45
 Taxas de sobrevivência, terapia do câncer e 790
 Tecido(s)
 arquitetura/organização
 comunicação intercelular e 121, 121F
 compartimento de células-tronco 464
 veja também Células-tronco
 prevenção do dano ao DNA 464-466, 465F, 490, 524
 especificidade ao câncer e reparo de DNA 496B, 522
 especificidade da expressão gênica 21
 morfogênese 25
 veja também Remodelamento no desenvolvimento/embriogênese, macrófagos 684
 tropismo, metástase 635F
 veja também tecidos específicos
 Tecidos imunoprivilegiados, antígenos 682
 Tecidos não-epiteliais, formação de tumor 31-32, 32F, 33F, 33T, 34T, 35F
 Técnica da imunoprecipitação da cromatina (ChIP) 289B
 Técnicas de transferência gênica *veja* Transfecção de DNA
 Tecnologia do DNA *veja* Métodos específicos
 Telófase 258, 258F
 Telomerase 376-380, 396
 aversão à crise 376-380, 380F
 camundongo *mTR knock-out* (*mTR*^{-/-})
 diferenças generacionais 387-388, 387F, 390
 susceptibilidade ao câncer 388-391, 391F
 camundongo vs. humano 386-387, 432
 ciliados 14F, 14B, 378, 378F
 como alvo terapêutico 385-386, 396
 complexo holoenzimático 377-378, 378F, 379F
 RNA molde 377, 378, 381, 387, 388B
 transcriptase reversa *veja* Gene/proteína *hTERT*
 disqueratose congênita e 388F, 388B, 391
 em células de câncer 376-377, 379-380, 380B, 381-383, 392, 396
 neuroblastomas 383F, 383B
 em células normais 376, 377B
 ensaio TRAP 376, 377F
 expressão induzida por Myc 287B
 papéis biológicos 379-380
 regeneração de telômero 376, 381F, 381B

- regulação da expressão 379B
 repressão 376
 senescência celular e 381F, 381B
 superexpressão em camundongo 386-388, 386B
 supressão
 indução de crise 382
 por hTERT mutante 381-382, 382F
 por RNA anti-senso 381
- Telômero(s)
 camundongo vs. humano 386-387
 comprimento crítico 385
 comprimento e prognóstico 393
 comprimento vs. potencial replicativo 375B
 descoberta 369F, 393
 encurtamento/perda
 células pré-malignas 389, 389F, 392
 ciclos de quebra-fusão-ponte *veja* Ciclos de quebra-fusão-ponte (BFB)
 digestão por exonuclease 375
 doença inflamatória crônica 393, 394F
 envelhecimento e 394-395, 395F, 395B, 396
 fusão cromossômica extremidade-extremidade e 369, 369F, 370
 indução de crise celular 369, 370, 372
 perda progressiva 375
 prognóstico e 393
 proliferação celular e 370, 370F, 453
- estrutura 373-374
 alças T 373, 373F
 projeção 3' 373F, 381F, 381B
 proteínas ligadas 369F, 373-374, 374F
 seqüência repetitiva de DNA (TTAGGG) 370, 373
 hibridização por fluorescência *in situ* (FISH) 369F
 na disqueratose congênita 388F, 388B
 proliferação celular e 368-372
 regeneração/manutenção
 mecanismo ALT (não-telomerase) 383-386, 384F, 385F, 391, 392, 397
 necessidade para a transformação 433
 telomerase e 376, 381F, 381B
 veja também Telomerase
 replicação 374-375, 375F
- Temin, Howard 62-63, 63F, 424
- Tenascina, substrato para metaloproteinase de matriz 622
- Tensão de oxigênio, senescência celular e 365, 365F
- Teoria do "código postal vascular", metástase 637
- Terapia antiidiótipo paciente-específica 709-710
- Terapia antiidiótipo
 acentuamento citotóxico 711-712
 anticorpos anti-CD20 710-711, 711F
 veja também Rituxan
 desenvolvimento 709
 paciente-específica 709-710
 recaídas 710
 seletividade 710
 trabalhos futuros 711
 tumores de células B 708-709, 710F
- Terapia com enzima pró-droga 713
- Terapia do câncer 725-796
 alvos protéicos 734-737, 736T
 alvos protéicos não-potenciais para o desenvolvimento de drogas 737
 fatores de transcrição 737-738
 alvos protéicos potenciais para o desenvolvimento de drogas 737, 738F, 793
 interações proteína-proteína 738-739
 receptores nucleares de drogas 737-738
 ativação de sinais pró-apoptóticos 733-734
 aumento na taxa de sobrevivência 790
 desenvolvimento 726
 desenvolvimento de drogas *veja* Desenvolvimento de drogas
 efeitos colaterais 728
 efeitos em células-tronco tumorais 765, 765F, 765B, 792
 efeitos não-neoplásicos em células estromais 792
 especificidade, importância do subtipo de câncer 729-730, 732
- importância do diagnóstico 727-728, 729-730, 732, 787-788
 importância do subtipo de câncer 727-728
 câncer de mama 787
 indução da diferenciação 732-733
 mortalidade e 40B
 mutação na p53 e 351
 polimorfismo na e 42F, 425
 problemas bioquímicos de proteínas 737-743
 sinalização autócrina e 135B
 tratamentos com múltiplas drogas 790-791, 792B
 resistência a drogas 756
 vazamento de microvasos e 265, 27F
veja também Diagnóstico de câncer; cânceres específicos; terapias específicas
- Terapia gênica
 genes supressores de tumor e 250-252
 vetores
 carcinogenicidade 87B
 retrovirais 79
- Terapias antiangiogênicas 574-580, 578T
 angiostatina 576
 em terapias normais de cânceres resistentes a 57B
 modelo de camundongo transgênico Rip-Tag *veja* Modelo de camundongo transgênico Rip-Tag
 resistência a 576B
 terapia com radiação 580, 581F
 vazamento nos microvasos e 265, 27F
veja também terapias específicas
- Terapias anticâncer *veja* Terapia do câncer
- Teratógenos, ciclopamina como 777, 777F
- Teste de Ames 49-51, 50F, 56
 diferenças epidemiológicas de risco 54B
 problema do promotor tumoral 453, 454
- Teste de modelo celular, desenvolvimento de drogas *veja* Desenvolvimento de drogas
- Testes 297T, 689
- Testes clínicos 751-755
 fase I 751-752
 dose máxima tolerada (MTD) 751
 dosimetria 751
 efeitos colaterais/toxicidade 751
 farmacocinética 751
 farmacodinâmica 751, 753F
 janela terapêutica 752
 monoterapia vs. terapia com múltiplas drogas 790-791
 voluntários nos quais o tratamento falhou 752
 fase II 752-754
 fase III 754-755
 licença 754
veja também drogas específicas
- Testes pré-clínicos (estudos com animais) *veja* Desenvolvimento de drogas
- Testosterona, promoção de tumor 440, 457
- 12-O-Tetradecanoilforbol-13-acetato *veja* IPA (12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato)
- Tetrahymena pyriformis* 14F
- Tetrahymena thermophila*, telômeros 14B
- Tetraploidia 510
- Thermus aquaticus*, proteínas de reparo de pareamento errôneo 478F
- Tiam1, motilidade celular, metástase 629
- Timinaglicol 482, 483F
- Tipifarnib 43B
- Tirosina(s) cinase(s) 126, 154, 156
 antagonistas sintéticos 45B, 45T
 inibidores, como alvos de drogas 745
 Jaks (Janus cinases) 141, 143, 157, 186
 receptores como *veja* Receptores tirosina cinase (RTKs)
veja também cinases específicas
 vias de sinalização mitogênicas 126
- Tirosinase, antígeno associado a melanoma 688, 688F, 691
- TNP-470, terapia antiangiogênese 577
- "Tolerância central," "tolerância perimetral" 682
- Tolerância imunológica 668-669, 681, 720, 722
 estabelecimento da 682
- quebra da 668, 689
veja também Doenças auto-imunes
 tolerância "periférica" vs. "central" 682
 "Tolerância periférica" vs. "tolerância central" 682
- Topoinibição 63
- Toxicidade (droga) 751, 781
- Traços/genes recessivos 3F, 4
- Tradução 16, 18F, 176
- TRAIL 343, 344F
- Transcrição 16, 18F
 Regulação da *veja* Controle transcricional
veja também Expressão gênica; RNA; Fatores de transcrição
- Transcriptase reversa 24, 62F, 74, 74F
 descoberta 63F
 holoenzima telomerase (hIERT) 377, 378, 378F
- Transdiferenciação 34
- Transdução de sinal 16, 120
 cinética 201
 da superfície celular para o núcleo 161-164
 independência de ligante 130-131, 131F
 indução da ciclina D1 266F
 mecanismos 200-201
 rede ErbB 120F
veja também Comunicação intracelular; vias específicas
- Transfecção de cálcio mediada por fosfato 96, 96F
- Transfecção de DNA
 análise da p53 313
 detecção de oncogenes celulares 93-98, 98F, 115
 método 96-97, 96F
 transformação por 93-98, 98F, 424-425
 experimentos de co-transfecção 427-428, 428F
 utilidade da técnica 975
- Transferência adotiva *veja* imunização passiva
- Transferrina, antígeno associado a melanoma 688
- Transformação viral 61-63, 56-87, 88-89, 91
 ativação de proto-oncogene 79-50, 82-54, 83F, 86, 89
 efeitos fenotípicos da 69-71, 69T, 70F, 88, 122
 interações com a proteína fosfatase 2A 19F, 19B
 manutenção da 63-65, 65F, 73, 74B, 88, 89
 mutagênese insercional 82-84, 83F, 85B, 85T, 86, 59, 105
 natureza dominante da 210, 212-213
 oncogenes/oncoproteínas virais 77, 78, 79, 50, 81T, 84
 colaboração 18B
 interações com RB 275, 279F, 284, 297
 múltiplos 427
veja também Oncogene(s); genes/proteínas específicas; vírus específicos
- Transformação
 agentes não-mutagênicos *veja* Agentes não-mutagênicos (promotores de tumor)
 ativação de oncogene
 experimentos de transfecção da Ras 93-98, 96F, 98F, 115, 424, 425
 veja também Oncogene(s); Proto-oncogene(s)
 carcinógenos e *veja* Carcinógenos
 células humanas, resistência à 431-434
 cura de ferimentos 430B
 experimentos com camundongos transgênicos
 mutações colaborativas 429-430, 431
 mutações únicas 426, 426F
 mediada por vírus *veja* Transformação viral
 mutações colaborativas 427-429, 4281, 434B, 459
 animais transgênicos 429-430, 431F
 experimentos de co-transfecção 427-428, 425F
 mecanismos fisiológicos 428-429, 429T
 tipos funcionais 428
 vias de sinalização intracelular 428-429, 460F
 vírus de DNA 427
 mutações únicas, falta de capacidade transformante 424-427
 camundongos transgênicos 426, 426F
 células primárias 425
 estudos de gêmeos 426F, 427, 427B

- mutações na linhagem germinativa de Kit 426-427
- mutágenos *veja* Mutágeno(s)
- papel de fatores de crescimento/receptores 119-158
veja também Sinalização celular; Fator(es) de crescimento; Receptor de fator de crescimento; Tradução de sinal
- papel supressor de tumor *veja* Genes supressores de tumor (TSGs)
- prostaglandina E₂ e 450
- veja também* Imortalização; Mutações(ões); Tumorigênese; Progressão tumoral
- vias intracelulares envolvidas 432F
- "cenário de 5 tentativas" 432-433, 434
- Transfosforilação 135-140, 157, 204
- conseqüências 137
- dimerização e 136-137, 137F
- domínios SH2 e 168, 168F
- Src 124
- Transgenes 430
- Transição mesenquimal-epitelial (MET) 605, 606F
- cura de ferimentos 542, 543F, 544F
- veja também* transição epitelial-mesenquimal (EMT)
- Translocações cromossômicas 13B, 511, 525
- ativação de oncogene 109-110, 109F, 111F, 112, 113F, 114, 114T 116
- cromossomo filadélfia *veja* Cromossomo filadélfia
- eliminação de ARF e 6B
- erosão telomérica e 375
- fusões gênicas 112, 113F, 116
- imunologia tumoral 681-682
- oncogene bcl-2 334
- perda de heteroziguidade e 220B
- recíprocas 13B
- Translocações recíprocas 13B
- ativação de c-myc 109-110, 109F, 116, 511
- Transplante de rim
- malignidade associada à transplantação 680T
- micrometástases 646
- Transplantes de órgãos 677-678
- malignidade associada à transplantação 30B, 677-678, 677F, 680T
- rapamicina *veja* Rapamicina
- Transportador associado com a apresentação de antígeno (TAP1/2) 693, 694F
- Transversões 22B, 482
- Trastuzumab *veja* Herceptina
- Tratamento do câncer *veja* Terapia do câncer
- Tratamentos com múltiplas drogas 790-791, 792B
- Triagem de mutante, resistência Gleevec 762, 763F
- Triagem em larga escala (HTS) 44F, 44B
- Trifosfato de guanosina, ligação por proteínas G 146-147, 146F
- Triploidia 510
- Triptofanil-tRNA sintetase, supressão da angiogênese 572T, 574B
- Troca angiogênica 567-571
- efeitos distantes 570
- mastócitos 565B
- modelo de camundongo transgênico Rip-Tag 565, 566F
- Troca de cromátides irmãs (SCE), mutagenicidade análise 52B
- Trocas binárias 182B
- sinalização pela Ras 150-153, 164-165
- sinalização pela Rho 182
- Trombopoiese, Jaks (Janus cinases) 186
- Trombospondina-1 (Tsp-1) 332, 351, 547, 571-572, 572T
- TSTA *veja* Antígeno de transplante específico de tumor (TSTAs)
- Tumor de Wilms, síndrome de Li-Fraumeni 333F
- Tumor do estroma gastrointestinal (GISTs)
- mutações no gene/proteína kit 140B, 142F, 142B, 762-764
- linhagem germinativa 426-427
- terapia com SU11248 763-764
- terapia Gleevec 762-764, 764F
- Tumor maligno da bainha do nervo periférico (MPNSTs) 233, 233F
- Tumor(es)
- anaplásicos 34, 36F
- antigenicidade de 38B
- arquitetura 27
- benignos 27, 39, 54
- características essenciais 458
- células *veja* Células de câncer
- classificação, terapia com drogas e 41B
- clonalidade 362
- perspectiva darwiniana 413-416, 414F, 461
- monoclonalidade *veja* Monoclonalidade
- policlonalidade 40, 40F
- transformação pelo vírus do sarcoma de Rous 63
- células-tronco 416-420, 420F
- veja também* Expansão/sucessão clonal
- comportamento clínico 27
- dediferenciação 34
- derivação de tecidos normais 26-28, 54, 55
- epitelial 28-31, 55
- não-epitelial 31-32, 32F, 33F, 33T, 34T, 35F, 55
- tipos não-usuais 34, 36F
- derivado da crista neural 34
- desenvolvimento progressivo 34-39
- veja também* Tumorigênese; Progressão tumoral
- diversidade genética 421-423, 421f, 422F, 423F, 458
- efeitos endócrinos 28
- estroma *veja* Estroma tumoral
- experimentos de transplantação
- antígenos de transplantação associados a tumor (TATAs) 673F, 686
- antígenos de transplantação tumor-específicos (TSTAs) 673F, 686
- imunovigilância 670-671, 671F
- hibridização comparativa de genomas 422-423, 422F, 423F
- imunologia de *veja* Imunologia tumoral
- invasividade *veja* Invasividade
- malignidade 27, 39, 39F, 55
- metástases *veja* Metástases
- número de gerações necessárias 362, 363F
- pressão hidrostática dentro 26B, 27F
- primário 27
- secreção de hormônios por 37B
- tamanho, indicativas de metástase 590F, 590B
- veja também* Câncer; *malignidades específicas*
- Tumores agressivos, testes clínicos fase III 754
- Tumores anaplásicos 34, 36F
- Tumores autóctones, definição 671
- Tumores carcinóides duodenais, metástases 634-635
- Tumores CMS5 38B
- Tumores de células B, terapia antiidiotipo 708-709, 710F
- veja também* Tipos específicos
- Tumores fortemente imunogênicos 675, 676F
- Tumores fracamente imunogênicos, imunologia tumoral 675, 676F, 723
- Tumores induzidos quimicamente 385
- Imunologia tumoral 672, 673F
- RAG-2 675, 676F
- veja também* Carcinógenos; *compostos químicos específicos*
- Tumores mesenquimais 31-32, 32F, 55
- Tumores neuroectodermis 32, 34T, 35F, 55, 138
- Tumores no cérebro 32, 34T, 35F
- citometria de fluxo 418F
- metástases de câncer de 588
- receptores de transplantes de órgãos 680T
- veja também* tipos específicos
- Tumores policlonais 40, 40F
- Tumores primários
- definição 587
- efeitos em tecidos normais 588
- indicações de metástase 588-589
- tamanho do tumor 590F, 590B
- mortalidade 588
- Tumorigênese
- abordagem reducionista 528
- alterações epigenéticas 399, 408, 412, 43B
- seleção darwiniana e 415, 423
- células do estroma *veja* Estroma tumoral
- como processo múltiplas etapas 399-462, 406F
- cânceres familiares e 413
- circunvenção 430B
- epidemiologia do câncer de pulmão e 406F, 408, 424B
- epidemiologia e 402B
- expansão clonal *veja* Expansão/sucessão clonal
- importância de mutações iniciais 457-458
- iniciação 436
- mutações *veja* Mutações(ões)
- progressão 437
- promoção 436
- cura de ferimentos *vs. veja* Cura de ferimentos
- derivação de tecido epitelial 528
- diferenciação celular e 292
- erosão de telômeros durante 389-391, 389F, 392
- ciclos BFB e 390-391, 392, 392F, 393, 396
- veja também* Telomerase; Telômero(s)
- escala de tempo 400-403
- evolução de defesas contra 362-363, 399-400
- genes supressores de tumor e *veja* Genes supressores de tumor (TSGs)
- imortalização e *veja* Imortalização
- indução viral 69-71
- integrina(s) e 150F, 150B
- interações heterotípicas *veja* Interações heterotípicas
- mecanismos citotóxicos 439-440, 440F, 440B
- oncogenes e *veja* Oncogene(s)
- proliferação celular e 362, 393F
- promotores de tumor e *veja* Agentes não-mutagênicos (promotores de tumor)
- sistema imune e 70B
- testes para 70-71, 71F, 88
- veja também* Carcinogênese; Mutagênese/mutagenicidade; Transformação; Progressão tumoral; *malignidades específicas*
- Tumorigenicidade, subpopulações de células tumorais 417-418, 417F, 418F
- Tumstatina, supressão da angiogênese 572T, 574
- U**
- Ubiquitilação (ubiquitinação) 242-243B, 242F
- "ciclos fúteis" 244, 315
- degradação de ciclina 265, 283F
- gene/proteína *p27KIPS* 281, 284
- monoubiquitilação 243B
- núcleos de genes 31B
- poliubiquitilação 243B
- proteína p53 318-319
- regulação HIF-1 244, 244F
- vantagens 242T
- veja também* Proteossoma(s); Degradação/reciclagem proteica
- β-catenina 189-190
- Ubiquitina 242B
- União de extremidades não-homólogas (NHEJ) 508-509, 509F
- Urotélio, cancerização de campo 16B, 17F
- V**
- Vacina de vírus, efeitos de Gleevec 46B
- Vacina para pólio, contaminação com o vírus SV40 67
- Vacina(s)/vacinação
- contaminação de com o vírus SV40 67
- efeitos de Gleevec 465
- papilomavírus humano 726-727
- vírus da hepatite B 726-727

- Vacuolação, vírus SV40 66-67, 66F
- Variabilidade genética
 genomeas tumorais 421-423, 421F, 422F, 423F
 mutação *veja* Mutação(s)
 polimorfismo *veja* Polimorfismo
- Variação geográfica 44T, 55-56
 câncer no fígado 444B
 genes vs. ambiente 44
 taxas de incidência país para país 44, 45F
 taxas de mortalidade 44-45
veja também Fatores ambientais; Etnicidade/raça, risco de câncer e
- Variações na ploidia *veja* Aneuploidia; *anormalidades específicas*
- Vasos linfáticos
 associados a tumor 562-563, 564F
 células endoteliais 532
 produção *veja* Linfangiogênese
- Vasos sanguíneos
 células endoteliais 532
 formação *veja* Angiogênese
- VDUP1, gene supressor de metástase 643T
- Velcade 769, 772-776
 mecanismo de ação 772, 772F, 774-775
 sinergia quimioterapêutica 773, 773F
 terapia de mieloma múltiplo 773, 773F
 testes clínicos 773
- Vesícula (apoptótica) 329, 330F
- Vesícula biliar, inflamação e câncer 442, 443F
- Vias de sinalização
 desenvolvimento de drogas 791
 envolvidos na transformação em humanos 432-433, 432F
 inflamação e 444-452, 451F
 intercelular *veja* Comunicação intercelular
 intracelular *veja* Comunicação intracelular
 proteossomas 773
veja também moléculas/vias específicas
- “Vício de oncogene” 770-771B
- Vimentina 543F, 602, 603F, 608F, 609
- Vírião 60B, 62F
- Vírus BK 67B
- Vírus da eritroblastose aviária, malignidades hematopoiéticas 470B
- Vírus da hepatite B (HBV)
 carcinoma hepatocelular 87, 115, 678, 726-727
 aflatoxina-B1 (AFB1) 444, 487, 488F
 encurtamento dos telômeros 394B
 epidemiologia 444B
 papel na inflamação 442-443, 443F, 455
 como promotor de tumor 444
 desenvolvimento de vacinas 726-727
 oncogene HBX 443
 receptores de transplantes 678
 taxa de infecção 456
- Vírus da hepatite C (HCV)
 carcinoma hepatocelular 87, 115, 678
 encurtamento dos telômeros 394B
 papel na inflamação 443-444, 443F, 455
 receptores de transplantes 678
 taxa de infecção 456
- Vírus da leucemia aviária (ALV)
 ativação do proto-oncogene 82-84, 83F, 86
 captura de *src* pelo 78F, 78B
 estrutura genômica 76F
 evolução 80
- Vírus da leucemia de Friend, sinalização autócrina 134B
- Vírus da leucemia felina 80
- Vírus da leucemia murina (MLV) 86
 inibição de ARF 6B
 mutagênese insercional 82-84
 vetores de terapia gênica 87B
 vírião 62F
- Vírus da mielocitomatose MC29, oncogene *v-myc* 80
- Vírus de DNA 60B
 antígenos T *veja* Antígenos T
 ciclo de vida 95
 genomas 89, 427
 indução de câncer 65-69, 427
 colaboração de oncogenes 18B
 integração no genoma do hospedeiro 71-73, 72F
 interações com a oncoproteína p53 9F, 95, 308-309, 308F, 309F, 309T
 interações proteicas com a oncoproteína-Rb 95, 274-275, 275F, 276F, 279, 284, 297, 309T
 mutações/alterações necessárias 185
 interação com a proteína fosfatase 2A 19F, 19B
veja também tipos individuais
- Vírus de RNA 60B
 ciclo de vida 74F
 genomas 60B, 71, 73F, 89
 indução de câncer 58-65
 integração no genoma do hospedeiro 73-75
veja também Retrovírus; *tipos individuais*
- Vírus de tumor 48, 55, 57-89, 91-92, 114T
 contribuição de Rous 58-61, 59F
 integração no genoma do hospedeiro
 retrovírus 73-75, 74F, 82-84
 vírus de DNA 71-73, 72F
 vírus de DNA vs. RNA 75
 receptores acoplados à proteína G (GPCRs) 192T
 transformação celular *veja* Transformação viral
 tumorigenicidade 69-71, 70B
veja também vírus específicos
- vírus de DNA *veja* Genomas de vírus de DNA 66T, 67-68, 68F
- vírus de RNA *veja* Vírus de RNA
- vírus lentos 82-84
- Vírus de tumor mamário de camundongo (MMIV) 65, 85B, 88B, 430
- Vírus do fibroma de Shope 68
- Vírus do macaco Yaba 68
- Vírus do sarcoma de Harvey 80
- Vírus do sarcoma de Kirsten 80
- Vírus do sarcoma de Rous (RSV) 86
 ciclo de vida 74F
 descoberta 58-61, 59F, 88
 genoma 62F, 76F
 integração no genoma do hospedeiro 73-75, 74F
 mutantes sensíveis à temperatura (ts) 64-65, 65F, 88
 reinfeção 74B
 replicação 73-75, 74F
 transformação celular 61-63, 88
 clonalidade 63
 comportamento celular que se segue 62-63, 88
 formação de focos 61, 63F, 64F
 gene *src* *veja* Gene(s) *src*
 genes codificados por vírus 75
 manutenção do 63-65, 65F, 73, 74B, 88
veja também Transformação viral
 vírião 62F
- Vírus do sarcoma simiano, especificidade de tipo celular 133
- Vírus JC 67B
- Vírus linfotrópico da célula T humana tipo I (HTLV-I) 9B, 84, 90
- Vírus oncogênico *veja* Vírus tumoral
- Vírus SV40
 antígeno large T 9B, 308, 427
 expressão 70-71, 71F
 imortalização e 366F, 367, 432
 interações com a p53 9B, 308, 308F, 309F
 interações com a proteína Rb/bolso 9B, 275, 276F, 276B
 prevenção da senescência 366F, 367
 antígeno small T, interação com a proteína fosfatase 2A 19F, 19B
 contaminação de vacinas 67
 descoberta 66
 efeitos citopáticos (ciclos líticos) 66-67, 66F
 efeitos fenotípicos 69
 estrutura 66F
 experimentos de transfecção 97B
 expressão da p53 e 327
 integração no genoma do hospedeiro 70-73, 72F, 75, 75F
 mesotelioma e 67B
- Vírus
 capsídeo protéico 65
 ciclos de vida 60F, 60B, 74F
 efeitos citopáticos 57
 formadores de tumor *veja* Vírus de tumor
 genomas *veja* Genoma(s) viral(ais)
 imunoevasão 34B
 indução de câncer *veja* Transformação viral
 interação hospedeiro-vírus 60B
 resposta imune humoral 720
 transplantes de órgãos e 678
veja também infecções/organismos específicos
- Vitiligo, resposta auto-imune ao melanoma 688, 659F
- v-myc *veja* Gene(s)myc
- v-src *veja* gene *src*
- W**
- Warts 37, 39, 65
veja também Papilomavírus
- Watson, James D. 1
- X**
- Xenobióticos, como mutágenos 225, 494B
- Xeroderma pigmentoso (XP) 23B, 499-500, 499F, 500F, 521
- Y**
- Yamagiwa, Katsusaburo 47, 47F
- Z**
- Zarnestra (tipifarnib) 43B
- ZD1839 *veja* Iressa
- ZD6474, terapia antiangiogênese 578T
- ZD61 26, terapia antiangiogênese 578T
- Zona de transição epitelial, metaplasia 36-37